

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA
DE CEPAS DE *Xanthomonas* AISLADAS A PARTIR DE CULTIVOS
COMERCIALES DE VENEZUELA.**

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Br. Anderson Escalante

C.I. 19.049.022

Br. María Alejandra Roa

C.I. 19.731.341

Tutora:

Dra. Elizabeth Pérez-Pérez

Mérida, Octubre de 2014.

DEDICATORIA

A nuestros padres, que con su amor, esfuerzo, dedicación y humildad han sabido guiarnos hacia la construcción de nuestras metas, quienes con su paciencia han tolerado nuestros traspies y equivocaciones y a quienes se les ha llenado el corazón de felicidad con cada uno de nuestros retornos a casa. Este logro también es de Ustedes. Los Amamos.

Anderson Escalante.

María Alejandra Roa.

A mi hermano Anthony, porque ahora más que nunca estamos unidos, por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo y generando en mi la motivación extra para seguir adelante. Ésta meta también es tuya. Te amo.

Anderson Escalante.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios primeramente, por habernos acompañado y guiado a lo largo de este camino, por ser nuestra fortaleza en momentos de debilidad y por brindarnos una vida llena de aprendizajes, experiencia y felicidad.

A nuestros padres. Sixta, María y José. Por su apoyo infinito e incondicional, por sembrar en nosotros grandísimos valores y por regalarnos la oportunidad de transitar nuestra vida por el camino de la educación. Son Uds. nuestro mayor motivo de celebración.

Agradecemos la confianza, el apoyo y la dedicación brindada por nuestra querida tutora y amiga: Elizabeth Pérez. Por compartir con nosotros sus conocimientos y por ser el sostén de este trabajo.

A nuestros familiares, quienes siempre estuvieron al pendiente de nuestras actividades y evolución, demostrándonos su preocupación, apoyándonos en nuestros momentos difíciles, compartiendo nuestras alegrías y brindándonos su total apoyo.

Agradecemos a todos aquellos profesores y amigos que participaron directa o indirectamente en la realización de esta investigación. Por su ayuda y acompañamiento un Dios les pague.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, Mérida. Por ser nuestro segundo hogar en este arduo camino, permitiéndonos así elaborar este proyecto dentro de sus instalaciones.

AL CDCHT, de la Universidad de Los Andes, por el financiamiento de este trabajo, bajo el número de proyecto FA-503-11-03-F.

Anderson Escalante.

María Alejandra Roa.

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Xanthomonas es un género de Proteobacterias, cuyos miembros causan enfermedades en las plantas, y representan una de las bacterias de mayor importancia epidemiológica en las zonas tropicales. Además, varios de los miembros de este género son productores de goma xantano, un producto natural emulsificante y espesante que tiene amplios usos en la industria alimentaria, textil, petrolera, entre otras. Debido a la importancia como fitopatógenos y su interés biotecnológico, se ha incrementado el interés en aislar y caracterizar fisiológica, bioquímica y genéticamente cepas de *Xanthomonas* aisladas de ambientes naturales. Es por ello que en este trabajo se realizó la identificación y caracterización fisiológica de tres aislados bacterianos presuntamente pertenecientes al género *Xanthomonas*, provenientes del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCN) de la UCV, aislados a partir de cultivos comerciales de Venezuela, e identificados como M2044, M2059 y M2093. Por medio de la realización de estudios macro y micromorfológico, pruebas bioquímicas, galerías API20NE y comparación de la secuencia que amplifica para el ADNr 16S, los aislados fueron identificados como *X. campestris* 2044, *X. campestris* 2059 y *X. vesicatoria* 2093, existiendo una excelente concordancia entre las pruebas bioquímicas y moleculares. En cuanto a la caracterización fisiológica, las cepas *X. campestris* 2044 y *X. campestris* 2059 resultaron ser sensibles a una amplia gama de antibióticos tales como ampicilina, amoxicilina, cefalotina, cefotaxima, cefadroxilo, kanamicina, gentamicina y ceftriaxona; mientras que *X. vesicatoria* 2093 resultó ser sensible a todos los antibióticos ensayados, excepto kanamicina. *X. campestris* 2044 y *X. campestris* 2059 fueron resistentes a todas las concentraciones ensayadas de sulfato de níquel, pero solo a 2 mM de sulfato de cobre; y *X. vesicatoria* 2093 fue resistente a 2 mM de sulfato de níquel y sulfato de cobre.

Palabras clave: *Xanthomonas*, Proteobacterias, ADNr 16S, caracterización fisiológica.

ABSTRACT

Xanthomonas is a genus of Proteobacteria, whose members cause diseases in plants, and represent one of the most important epidemiological bacteria in the tropics. In addition, several members of this genus are producers of xanthan gum, a natural product with emulsifier and thickener properties, with wide applications in the food industry, textile, oil, among others. Due the importance as pathogens and producers of natural products with biotechnological applications, has increased the interest in isolating and characterizing physiological, biochemical and genetically *Xanthomonas* strains isolated from natural environments. In this work was performed the identification and physiological characterization of three bacterial isolates belonging to the genus *Xanthomonas*, from the Venezuelan Center Collections of Microorganisms (CVCM) (UCV), isolated from commercial crops of Venezuela, and identified as M2044, M2059 and M2093. Through studies macro and micromorphological, biochemical tests, API20NE galleries, and sequence comparison of 16S rDNA amplicon, the isolates were identified as *X. campestris* 2044, *X. campestris* 2059 and *X. vesicatoria* 2093, there being excellent agreement between biochemical and molecular tests. In reference to physiological characterization, the strains *X. campestris* 2044 and *X. Campestris* 2059 are susceptible to several antibiotics such as ampicillin, amoxicillin, cephalothin, cefotaxime, cefadroxil, kanamycin, gentamicin, and ceftriaxone; *X. vesicatoria* 2093 was sensible to all antibiotics tested except kanamycin. None of the strains under study showed resistance to mercury chloride, while *X. campestris* 2044 and *X. campestris* 2059 were resistant to all concentrations of nickel sulfate, but only 2 mM copper sulfate; and *X. vesicatoria* 2093 was resistant to 2 mM nickel sulfate and copper sulfate.

Key words: *Xanthomonas*, Proteobacteria, ADN_r 16S, physiological characterization.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INDICE GENERAL.....	vii
INDICE DE ESQUEMAS	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE TABLAS	xi
CAPITULO I: EL PROBLEMA.....	1
I.1. Planteamiento del problema	1
I.2. Formulación del problema	8
I.3. Objetivos.....	8
I.3.1. Objetivo general.....	8
I.3.2. Objetivos específicos.....	8
I.4. Justificación del problema	9
CAPITULO II:MARCO TEÓRICO	12
II. 1. Antecedentes de la investigación	12
II.2.-Bases teóricas.....	17
II. 3. Antecedentes históricos.....	22
CAPITULO III:MARCO METODOLÓGICO.....	23
III.1. Diseño de la investigación	23
III.2. Población y muestra	24
III.3. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	24
CAPÍTULO IV:RESULTADOS	33
IV.1. Ubicación taxonómica de las cepas en estudio.....	33
IV.2. Caracterización fisiológica de las cepas en estudio	39
CAPITULO V:DISCUSION.....	44
V.1. Caracterización bioquímica e identificación microbiológica.....	44

V.2. Identificación molecular por medio de la comparación de la secuencia del gen <i>ADNr 16S</i> obtenido por PCR	46
V.3. Caracterización fisiológica de las cepas de <i>Xanthomonas</i> identificadas	49
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS	57
ANEXOS	68
Anexo 1. Medios de cultivo	68

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Diseño de la investigación.	23
---	----

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la goma xantana	21
Figura 2. Amplificación por PCR y purificación por precipitación con sales del gen ADNr 16S de las cepas aisladas. 1, escalera de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Promega); 3, cepa M2044; 4, cepa M2059; 5, cepa M2093 ...	37
Figura 3. Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>Xanthomonas</i> en estudio en medio MLD y YDC.	42

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislados bacterianos usados en este estudio.	24
Tabla 2. Lectura de resultados para batería de pruebas API.....	26
Tabla 3. Características macromorfológicas de las cepas sembradas en agar LB.	33
Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas.....	34
Tabla 5. Identificación microbiológica. Resultados pruebas API 20NE.....	36
Tabla 6. Análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen <i>ADNr 16S</i> de cada una de las cepas en estudio.....	38
Tabla 7. Resultados a nivel de aislado del estudio preliminar de resistencia a antibióticos.....	39
Tabla 8. Crecimiento de las cepas de <i>Xanthomonas</i> en estudio en presencia de diferentes fuentes de carbono.....	40
Tabla 9. Evaluación de la resistencia a metales pesados de las cepas de <i>Xanthomonas</i> en estudio.....	41

CAPITULO I

EL PROBLEMA

I.1. Planteamiento del problema

Los fitopatógenos son, en general, microorganismos que producen enfermedades en las plantas por medio de disturbios en el metabolismo celular causado por: (i) la secreción de enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias; (ii) por la absorción de nutrientes de la célula para su propio crecimiento; y (iii). por crecer y multiplicarse en el xilema y en el floema de la planta y, por ende, por bloquear el transporte de agua y nutrientes desde la raíz hacia las hojas, o el flujo de savia desde las hojas hacia el resto de la planta. Los microorganismos fitopatógenos pueden ser nemátodos, bacterias, virus, protozoarios, moluscos y hongos (Burger y Eichenlaub, 2003).

En todo el mundo, las bacterias fitopatógenas causan muchas enfermedades graves y económicamente dañinas, en menor número que los hongos o los virus. Pueden ocasionar desde manchas, mosaicos o pústulas en hojas y frutos, podredumbres malolientes de tubérculos, o la muerte de las plantas. Algunas causan una distorsión de las hojas y tallos, llamada fasciación o agalla de corona, la cual se caracteriza por una proliferación de células vegetales causando un abultamiento en el cuello de las plantas y sus raíces (Arnold *et al.*, 2003). La mayoría de las plantas, silvestres y cultivadas tienen inmunidad innata o resistencia a muchos patógenos. Sin embargo, muchas plantas pueden hospedar fitopatógenos sin desarrollar síntomas (asintomáticas). (Vidhyasekaran, 2002).

La mayoría de las bacterias fitopatógenas son Gram positivas, en el Phylum *Actinobacteria*, siendo los más importantes los géneros *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, y *Clavibacter*; o Gram negativas, clasificadas dentro del Phylum *Proteobacteria*, dentro de las que se describen cocos y

bacilos aerobios tales como *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xylella* y *Xanthomonas* (Kimati *et al.*, 1995).

Xanthomonas es un género de Proteobacterias, muchos de los cuales causan enfermedades en las plantas, y sus miembros representan una de las bacterias de mayor importancia epidemiológica en las zonas tropicales. Por ende, es remarcable por su fitopatogenicidad y su contrastante uniformidad fenotípica. Además, gracias a su importancia económica, el género ha sido sometido a una gran cantidad de estudios taxonómicos y numerosas discusiones acerca de la clasificación y nomenclatura de sus miembros (Schaad *et al.*, 2000).

Xanthomonas es una bacteria saprófita facultativa, es decir, que se desarrollan principalmente como organismos parásitos en las plantas hospederas, y parcialmente en el suelo como saprófitos, por lo que los cambios ambientales pueden afectar directamente su sobrevivencia y provocar cambios genéticos permanentes. Las especies del género *Xanthomonas* son bastones rectos, con dimensiones de 0.4 a 1.0 μm de ancho y 1.2 a 3.0 μm de largo, y se desplazan por medio de un flagelo polar. Las colonias son mucoides y convexas, son de color amarillo cuando se desarrollan en un medio de agar (medio YDC) gracias al pigmento xanthomonadina que contiene bromo, y la mayoría de ellas crecen muy lentamente. Todas las especies son fitopatógenas y se encuentran sólo en asociación con plantas o con órganos de éstas. En cuanto a las pruebas bioquímicas, los miembros del género *Xanthomonas* son Catalasa positivos, Oxidasa negativos, y crecen en un rango de temperatura entre 4 y 37 °C (Jiménez *et al.*, 2004).

El género *Xanthomonas* ha sido objeto de numerosos estudios taxonómicos y filogenéticos, y fue descrito por primera vez como la bacteria *vesicatorium*, infectando pimienta y tomate en 1921.(Burger y Eichenlaub, 2003).

Originalmente, cada una de las variantes de *Xanthomonas* se caracteriza por la variedad de síntomas clínicos que produce, fue clasificado como especie separada. Pero por la homogeneidad de los aislamientos y la escasa información sobre el taxón, condujo a varios científicos a abogar por fusionar todas las especies de *Xanthomonas* en una única especie: *X. campestris*. Posteriormente, se propuso su reclasificación bajo el término de patovares, básicamente por su patogenicidad. Actualmente se han identificado más de 140 patovares dentro del género (Zapata y Gaud, 2001).

Sin embargo, el patovar no es un nivel taxonómico aceptado y presenta varias limitantes, tales como: (i) en la mayoría de los casos, el ámbito de hospedantes de variantes de un patovar no se conoce, no ha sido antes determinado o publicado; (ii) en estudios de hibridación de ADN se ha encontrado alta heterogeneidad genómica dentro de patovares; y (iii) las *Xanthomonas* no patogénicas no pueden ser ubicadas dentro de ningún patovar (Vauterin *et al.*, 2000).

Muchos estudios se han orientado hacia delimitar los alcances de la definición de especies dentro del género, usando técnicas de "fingerprinting" (huella digital del ADN), electroforesis de las proteínas de la célula y cromatografía de gas de los ácidos grasos. Estas técnicas combinan varias ventajas: (i) analizan un gran número de muestras, lo que es necesario para obtener un panorama más preciso; (ii) evitan errores del uso de una sola técnica para la comparación utilizando para ello más de una variación en la técnica de huella genómica, y (iii) pueden establecer relaciones genómicas entre grupos (Vauterin *et al.*, 2000).

Mediante el uso de esas técnicas y el análisis estadístico de agrupamiento, se ha demostrado que los patovares de *Xanthomonas campestris* son más heterogéneos de lo que se estimaba. La homología del ADN, determinada por la hibridación de ADN de 183 variantes de *Xanthomonas*, ha permitido distinguir 20 grupos genómicos. Se confirmaron cuatro especies ya conocidas tales como: *Xanthomonas albilineas*,

Xanthomonas fragariae, *Xanthomonas populi*, y *Xanthomonas oryzae*, mientras que 16 grupos de homología del ADN fueron nuevos y no correlacionados con los patovares existentes. Estos 16 grupos fueron definidos como nuevas especies y tienen una homología interna superior al 80% (Rademaker *et al.*, 2000).

La nueva clasificación de *Xanthomonas* se adhiere a los principios del Código Internacional de Nomenclatura, pero esencialmente a dos reglas. Primero, cuando una especie es dividida en dos o más especies, el epíteto específico de la especie original debe ser mantenido por uno de los taxones en los que se ha dividido la especie. En segundo lugar, cuando uno o dos taxones del mismo rango son unidos, el nombre del taxón emergente es definido según la fecha de publicación. La mayoría de las enmiendas partieron del heterogéneo grupo de *X. campestris*, y el nombre fue reservado para el taxón que contiene las variantes tipo de la especie (Vauterin *et al.*, 2000).

Las bacterias del género *Xanthomonas* spp. pueden causar manchas bacterianas conocidas comúnmente como, plagas de las hojas, tallos y frutos en una gran variedad de plantas, enfermedad conocida como tizón. Las variedades patógenas de *X. campestris* producen el tizón común del frijol (pv. *phaseoli*), la mancha foliar angular del algodón (pv. *malvacearum*), el tizón foliar bacteriano del arroz (*X. oryzae*), el tizón bacteriano o raya de los cereales (pv. *translucens*), la raya foliar bacteriana del arroz (pv. *oryzicolá*), la mancha bacteriana de los frutos de hueso (pv. *pruni*) y del tomate y chile (pv. *vesicatoria*), la mancha foliar de la begonia (pv. *begoniae*), el tizón foliar de la gladiola (pv. *gummisudans*), la mancha foliar y pudrición del tallo del geranio (pv. *pelargonii*) y el tizón del nogal (pv. *juglandis*) (Kimati *et al.*, 1995) (Zhang y Wang, 2013).

Además, estas bacterias pueden producir marchitamientos vasculares, donde se distingue la pudrición negra o nervadura negra de las crucíferas (*X. pv. campestris*) y la gomosis de la caña de azúcar (*X. vasculorum*). Por

último, pueden causar lo que se conoce como cancros bacterianos, siendo de especial interés el cancro bacteriano de los cítricos (*X. citri* pv. *citri*) (Ryan *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que otra de las características importantes del género *Xanthomonas* radica en el hecho de que la mayoría de sus especies producen grandes cantidades de un exopolisacárido llamado goma xantana o xantano, el cual tiene una amplia gama de usos industriales incluyendo industrias como la de los alimentos, textil, farmacéutica, agrícola, minera, petrolera, ambiental y cosmética. Se ha usado para la fabricación de saborizantes, desodorantes, champú, cremas, lociones, maquillajes, pasta de dientes, antibióticos, espesante, herbicida, pesticida, tintas de impresión, entre otros. El xantano es producido por varios patovares de *Xanthomonas campestris* y por otras especies de *Xanthomonas* (Borges *et al.*, 2007).

Los xantanos son biopolímeros que poseen propiedades reológicas como viscosidad, efecto elástico y solubilidad. Debido a su estructura, son solubles en altas concentraciones de sales, y su viscosidad no depende tanto de su temperatura ni del pH. Al tener un comportamiento pseudoplástico, son resistentes a los procesos de congelación y descongelación, así como a la degradación enzimática, y toleran el choque térmico. Pueden ser sintetizados por medio de monómeros naturales, los cuales pueden ser renovables, más ecológicos y rentables. El xantano se caracteriza por ser un polvo de color crema, el cual puede disolverse fácilmente en agua, logrando así obtener soluciones viscosas (Lachke, 2004).

La goma xantana tiene ciertas características que la hacen un producto espesante único, como por ejemplo (Lachke, 2004):

- La goma xantana es efectiva en todo tipo de fluidos de perforación de base agua, desde sistemas de bajo contenido de sólidos hasta los de alta densidad.
- La goma xantana es compatible y estable en presencia de alta concentración de sales.

- Se utiliza en lodos de agua dulce, agua de mar, sistemas saturados con sal y en sistemas KCl.
- La alta capacidad de la goma xantana produce una óptima limpieza del hueco perforado, en zonas de bajas velocidades anulares. Se logran máximas tasas de penetración al reducir al mínimo las pérdidas de presión para maximizar la potencia hidráulica y el adelgazamiento, lográndose una viscosidad mínima en la broca ó mecha.
- Es compatible con todos los aditivos normalmente utilizados y suspenderá adecuadamente los materiales densificantes. Los contaminantes como yeso, la anhidrita, el CO₂, el H₂S y las sales no tienen efecto sobre la viscosidad producida por el producto. Además, ésta no se afecta por los lignosulfonatos.

Un ejemplo importante del uso del xantano se ha encontrado en la industria textil, ya que se ha demostrado que estos biopolímeros remueven significativamente los colorantes empleados en la industria textil de la solución acuosa, siendo necesario investigar acerca de que grupos funcionales participan en el proceso de bioadsorción, para entender mejor la formación del complejo biopolímero-colorante (Nigam, *et al.* 2001).

Otro uso del xantano es en la extracción de petróleo, donde los exopolisacáridos microbianos se emplean en el llenado y en el proceso de recuperación del petróleo, actuando como viscosificantes. Se requiere el empleo de un fluido con comportamiento pseudoplástico, donde la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla. Durante la operación de perforación, las soluciones deben ser lo suficientemente fluidas para facilitar el bombeo de la mezcla, y cuando la operación se detiene, la viscosidad debe aumentar para que los sólidos se mantengan en suspensión y poder ser estables bajo condiciones extremas de temperatura y pH. Tanto la goma xantana como el succinoglucano, se emplean como aditivos en muchas etapas del proceso de perforación, producción, transporte y procesamiento de crudo (Sutherland, 1990). Es importante destacar que a pesar de que

Venezuela es un país con una economía dependiente principalmente de la renta petrolera, no se produce xantano, y todo el que es usado es importado ocasionando grandes costos de producción.

Debido a sus múltiples usos, la goma xantana es uno de los mayores biopolímeros comercialmente producidos, con una capacidad anual de producción de 30.000 toneladas, lo que se traduce en ganancias de 408 millones de dólares, a pesar de que en sus procesos de producción se encuentre o utilicen diferentes sustratos. (Kalogiannis *et al.*, 2003). Actualmente los mayores productores de xantano son Merck y Pfizer en Estados Unidos, Rhône Poulenc y Sanofi-Elf en Francia, y Jungbunzlauer en Austria (Ripoll, 2009).

La producción de xantano es un proceso estrictamente aeróbico y se realiza en medios líquidos o semi-sólidos. Son muchos los estudios que se han realizado acerca de la producción industrial de goma xantana, y cuáles son los factores a controlar para incrementar su producción. Se ha encontrado que los niveles en la producción de xantano están relacionados: la sensibilidad de la bacteria a ciertos antibióticos (Torrestiana *et al.*, 1990); que depende de las condiciones óptimas de crecimiento celular, composición del medio de cultivo y factores ambientales tales como pH y temperatura (Azuaje, 1999); que deben controlarse las condiciones de aireación y agitación para controlar las condiciones de aerobiosis (Borges *et al.*, 2007); y que se pueden emplear medios de cultivos alternativos, por ejemplo, suplementados con melaza, para la producción industrial de xantano por parte de *Xanthomonas campestris* PTCC1473. (Gilani *et al.*, 2011).

El aislamiento y caracterización de cepas de *Xanthomonas* de ambientes naturales sigue siendo el método más eficiente para identificar cepas productoras de altas cantidades de xantano de alta calidad reológica. Otros criterios considerados son la morfología de la colonia y la virulencia. La mayoría de la literatura referente a la producción de xantano está basada en cepas obtenidas de colecciones de cultivos, principalmente *Xanthomonas*

campestris NRRL.B-1459, y sus derivados. Son pocos los reportes acerca de la caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas* con respecto a la producción de goma xantana, por lo que se hace necesario realizar una exhaustiva caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas* en cuanto a su fisiología, características bioquímicas, identificación molecular, resistencia a antibióticos, metales pesados, concentraciones de sales, entre otras, que se puedan correlacionar con la producción de xantano.

I.2. Formulación del problema

De acuerdo con los antecedentes ya descritos y considerando las variables de estudio, se puede formular la siguiente interrogante: ¿Cuáles serán las características bioquímicas y fisiológicas de cepas de *Xanthomonas* aisladas a partir de cultivos comerciales de Venezuela?

I.3. Objetivos

I.3.1. Objetivo general

Caracterizar bioquímica y fisiológicamente cepas de *Xanthomonas* aisladas a partir de cultivos comerciales de Venezuela.

I.3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar bioquímica y fisiológicamente cepas de *Xanthomonas*, por medio de estudio macro y micromorfológico, y pruebas bioquímicas.
- Identificar microbiológicamente, por medio de pruebas API, cepas de *Xanthomonas*.
- Identificar molecularmente, por medio de PCR del ADN_r 16S, las cepas de *Xanthomonas*.
- Realizar la caracterización preliminar de la resistencia a antibióticos de las cepas de *Xanthomonas*.

- Evaluar la resistencia a metales pesados de las cepas de *Xanthomonas*.
- Evaluar el crecimiento de las cepas de *Xanthomonas* en diversas fuentes de carbono.
- Realizar cinéticas de crecimiento de las cepas de *Xanthomonas* en medio LB y YDC.

I.4. Justificación del problema

Como se ha mencionado anteriormente, las cepas del género *Xanthomonas* son de gran importancia por los valiosos roles que cumplen, entre los que se destacan ser fitopatógenas de cultivos de gran interés comercial en Venezuela, y por su capacidad de producir goma xantana.

En cuanto a su rol como fitopatógenas, se ha reportado qué cepas de *Xanthomonas* son los agentes causantes de enfermedades de gran interés en Venezuela, tales como pústula bacteriana en soya (*X. phaseoli* var. *Sojense*) (Polanco, 1974), tizón bacteriano de la cara (*X. campestris* pv. *dieffenbachiae*) (Guevara y Debrot, 1984), roña o sarna bacteriana en tomate y pimentón (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) (Kimati *et al.*, 1995), escaladura foliar de la caña de azúcar (*X. albilineans*) (Jiménez *et al.*, 2004), bacteriosis en cilantro (*X. campestris*) (Guevara y Maselli, 2005), mancha bacteriana en parchita (*X. axonopodis* pv. *passiflorae*) (Escalona y Contreras, 2011), entre otras.

El estudio llevado a cabo por Escalona y Rincón (2011) evidencia la importancia de este fitopatógeno en Venezuela. Los autores procesaron muestras de cultivos de cebolla, lechosa, papa, parchita, pimentón, tomate, pino caribe, heliconias y *Phalaenopsis*; además de muestras de agua y suelo de la zona centro occidental de Venezuela, con el objetivo de identificar la población bacteriana presente. Encontraron siete géneros de bacterias patógenas, siendo las principales *Erwinia* sp. Y *Xanthomonas* sp. con 36 y 34% de incidencia, respectivamente; seguidas por bacterias del grupo

Coryneformes (10 %) y otros géneros bacterianos como *Pseudomonas* (8 %), *Pantoea* (6 %), *Bacillus* (4 %) y *Arthrobacter* (2 %). Del total de muestras evaluadas, el principal problema diagnosticado fue causado por las pudriciones, lo cual concuerda con la sintomatología producida por el principal patógeno bacteriano identificado en las diferentes muestras analizadas.

El manejo de las enfermedades bacterianas se ha hecho mundialmente difícil debido a la resistencia a los fungicidas cúpricos y los antibióticos que durante muchos años han sido empleados en la agricultura. Esta situación ha motivado la búsqueda de alternativas biológicas. Entre ellas los extractos de plantas han resultado promisorios por su destacado efecto bactericida. Por ejemplo, Nalimova *et al.* (2005) estudiaron el efecto *in vitro* de extractos metanólicos de hojas y tallos de *Bixa orellana*, *Gliricidia sepium*, *Ocimum basilicum* y *Petiveria alliacea* frente a 14 aislados de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (4), *X. campestris* pv. *campestris* (1), *X. axonopodis* pv. *manihotis*(1), *X. axonopodis* pv. *malvacearum*(1) y *Xanthomonas* sp. (7), por medio del método de doble capa de agar y discos impregnados con los extractos a 12,5% (p/v) colocados en la superficie de la capa superior del medio de cultivo, inoculada con la suspensión bacteriana. El extracto de *B. orellana* resultó efectivo para 92,8% de las cepas estudiadas. Solo el aislamiento de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* no mostró sensibilidad. Los halos de inhibición oscilaron entre 17 y 21 mm de diámetro. Los extractos restantes no mostraron efecto sobre las bacterias estudiadas.

En lo que se refiere a su uso en la industria petrolera, la principal de Venezuela, se sabe que las demandas de goma xantana son enormes. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, los biopolímeros tales como la goma xantana son importados al país en grandes cantidades para poder satisfacer la demanda a nivel Nacional. Para el año 2011, según el INE, la cantidad importada fue de 1.466.578,13 Kg, por un costo total de Bs. 78.232.596 (\$ 18.193.434,48) (<http://www.ine.gov.ve/>). Así mismo, de

acuerdo al VIII Seminario Internacional de Fluidos de Perforación, Complementación y Cementación de pozos SEFLUCEMPO conjuntamente con PDVSA INTEVEP, se evidencia la necesidad de la producción de la Goma Xantana para su utilización como en la perforación y limpieza de pozos petroleros (SepluCempo, 2010).

A pesar de la importancia comercial del xantano y de los microorganismos productores del mismo, se sabe muy poco acerca de las vías bioquímicas involucradas en la biosíntesis de estos compuestos, así como los procesos de regulación a nivel de las mismas. Un buen conocimiento de estas vías y de los procesos de regulación sería de vital importancia ya que este tipo de información puede ser usada para controlar y optimizar la velocidad y el rendimiento del proceso fermentativo en la producción de xantano, así como también para mejorar sus características fisicoquímicas.

Por lo antes mencionado, se hace evidente la necesidad de caracterizar cepas de *Xanthomonas*, nativas de Venezuela, desde los puntos de vista fisiológico, taxonómico, bioquímico, molecular, entre otros, ya que esto conduciría al mejor aprovechamiento de los recursos biológicos y minerales de nuestro país, así como a la utilización y mejoramiento de procesos biotecnológicos, principalmente relacionados con la industria petrolera, la cual proporciona un gran aporte económico al país.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

II. 1. Antecedentes de la investigación

Velásquez *et al.* (1988) observaron la presencia de un quemado del follaje en plantaciones de ocumo de diferentes localidades del Estado Barinas, Venezuela, caracterizado por pequeños puntos cloróticos que con el tiempo se transforman en manchas necróticas que invaden la lámina foliar, provocando clorosis y flacidez de las hojas. Del tejido foliar con los síntomas señalados, se aisló una bacteria cuyas colonias siempre fueron de color amarillo y reprodujo los síntomas antes descritos en las pruebas de patogenicidad, con una concentración de 10^8 células/ml. La bacteria tenía forma de bastón y presentaba un solo flagelo polar. Además, resultó KOH positiva, desdobra con facilidad el almidón, gelatina positiva, catalasa positiva, produce H_2S , de reacción alcalina en agar dextrosa rojo fenol, oxidasa negativa, crece con facilidad en el medio D₅ de Kado y produce colonias translúcidas con un halo de varios milímetros en el medio SX de Shaad y White. Todo lo anterior coincide con lo señalado para el género *Xanthomonas*, específicamente para *X. sagittifolii*, siendo éste el primer reporte de una enfermedad bacteriana en ocumo en Venezuela.

Guevara y Maselli (1999) tomaron muestras de plantas de arroz (*Oryza sativa*) provenientes de Calabozo, estado. Guárico (Venezuela), con síntomas de estrías de color amarillento en las puntas de las hojas, que luego se extendían a toda la lámina foliar tomando aspecto de quemado. De los aislamientos realizados, tanto de hojas como de semillas, se obtuvo una bacteria que formó colonias bacterianas de color amarillo claro, la cual reprodujo los síntomas en las pruebas de patogenicidad. Para la identificación de la bacteria se observaron sus características, además se

realizaron una serie de pruebas bioquímicas y fisiológicas con el fin de caracterizarla. La bacteria tiene crecimiento mucoso en el medio YDC, forma de bastón corto y con un solo flagelo polar, Gram negativa, estrictamente aeróbica, Oxidasa negativa, producción de H₂S positiva, indol negativo, catalasa positiva, lecitinasa negativa, no reduce los nitratos, el crecimiento es inhibido por cloruro de tetrazolio al 0,1%; la hidrólisis de almidón fue negativa, licuefacción de gelatina variable, producción de ureasa negativa, utilización de citrato positivo y la hidrólisis de esculina positiva. La bacteria produjo ácido a partir de: glucosa, galactosa, sacarosa, trealosa, celobiosa, arabinosa, sorbitol, adonitol, maltosa y lactosa, pero no a partir de rafinosa y manitol, y no utilizó al sodio- propionato como fuente de carbono. Con base en los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad, a las características de la bacteria en estudio y a los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas, se determinó que la bacteria causante del quemado del arroz en Venezuela es *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Hernández y Trujillo (2000) colectaron muestras foliares de plantas de cuarentona provenientes de algunas localidades del estado Aragua (Venezuela), cuyas hojas presentaban manchas necróticas abundantes de 1-20 mm de diámetro o más, con un margen clorótico sobre la mayor parte del follaje. De las hojas con los síntomas descritos aislaron consistentemente una bacteria que produjo colonias de color amarillo, las cuales resultaron patogénicas al ser inoculadas en plantas sanas de cuarentona. La bacteria fue Gram negativa, aeróbica y con forma de bastón. De acuerdo a estas y otras características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, se identificó a la bacteria como *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, siendo el primer reporte de este patógeno para Venezuela.

Carrillo y col. (2001) obtuvieron 36 aislamientos de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* de hojas y/o frutos de tomate y chile con síntomas típicos de la Mancha Bacteriana, colectadas en diversas zonas hortícolas del Estado de Sinaloa (México). Los aislamientos bacterianos se sometieron a su

caracterización e identificación. Los clones, previamente purificados, se sometieron a las pruebas de tinción de Gram, tinción de flagelos y a pruebas bioquímicas como hidrólisis de almidón y producción de Catalasa. Una vez caracterizados, se procedió a la identificación de razas mediante la inoculación a un grupo de líneas diferenciales: ECW (susceptible), ECW 10R (gen Bs1), ECW 20R (gen Bs2), ECW 30R (gen Bs3) y PI 235047 (gen Bs4). De los 36 aislamientos colectados y probados, 17 correspondieron a la raza P3; 9 a la P0; 5 a la P2, 4 a la P1 y 1 a la raza P8.

Rodríguez *et al.* (2002) tomaron muestras de raíces de zanahoria presentando algunas áreas podridas, en diferentes comercios de frutas y hortalizas de los Estados Aragua y Miranda de Venezuela. A partir de esas muestras se aislaron en medio YDC diversas bacterias, las cuales fueron inoculadas en raíces frescas y sanas de zanahoria, reproduciéndose los síntomas iniciales y comprobándose su patogenicidad. La identificación de las bacterias patogénicas se realizó mediante características culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Los problemas diagnosticados fueron: pudrición blanda y oscura causada por *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia* sp, pudrición blanda clara causada por *Xanthomonas*, pudrición blanda parda causada por *Pseudomonas* sp, y mancha seca hundida causada por *Erwinia* sp. Para el aislado identificado como *Xanthomonas* sp, la colonia fue de color amarillo, mucoide, brillante, levantada y de bordes redondeados; creció bien a 36 °C durante 48 h en AN, YCA y YCDA; la bacteria exhibió forma de bastón (1,62-2,15 x 0,51-0,66 µm) con un flagelo polar. En cuanto a las características fisiológicas y bioquímicas resultó ser aerobia estricta, productora de H₂S, catalasa positiva, y fue capaz de producir gas usando como fuentes de carbono arabinosa, glucosa, manosa, sacarosa y dextrosa.

Gent *et al.* (2004) caracterizaron 49 cepas de *Xanthomonas* aisladas a partir de cebolla a lo largo de 27 años en California, Texas, Colorado, Georgia, Hawaii, Brasil, Venezuela, Barbados, Sur África y Japón. Evaluaron

la patogenicidad hacia cebolla, perfiles de ácidos grasos, patrones de utilización de sustratos, resistencia a bactericidas, fingerprinting de ADN. El crecimiento de todos los aislados fue homogéneo. Las poblaciones de cada región geográfica fueron uniformemente sensibles a 100 µg de CuSO₄, 100 µg de ZnSO₄, y 100 µg de sulfato de estreptomicina. Un modelo logístico de regresión basado en la composición de ácidos grasos y la utilización de sustratos, clasificó al 69% de las cepas dentro de su región de origen. Los análisis de fingerprinting de ADN revelaron que el 97% de las secuencias son similares entre las cepas en estudio; además, la existencia de cinco grupos de *Xanthomonas* asociadas a la cebolla, llegando a la conclusión de que las cepas examinadas en este estudio eran *X. axonopodis* pv. *allii*.

Alvez *et al.* (2011) llevaron a cabo el diagnóstico de la bacteria *Xanthomonas albilineans* (ashby) dowson, causante de la escaldadura foliar (EF) en caña de azúcar, a partir de plantas de caña de azúcar sintomáticas de Venezuela, empleando pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares. Los aislados se sometieron a análisis fenotípicos y bioquímicos, así como a ensayos de PCR con iniciadores específicos y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (siglas en inglés ERIC-PCR). De los 50 aislados originales, 14 se seleccionaron por pruebas microbiológicas y bioquímicas, y de éstos, sólo tres cepas fueron identificadas como *X. albilineans*. Este resultado se corroboró al obtener por PCR la banda esperada de 360 pb con los iniciadores específicos sólo en estos tres aislados. Finalmente, con la técnica de genotipificación ERIC-PCR se obtuvieron patrones de bandas para las bacterias identificadas como *X. albilineans* que no son similares a los descritos por otros autores en otras regiones del mundo. Este trabajo representó la primera genotipificación de aislados de *X. albilineans* en Venezuela.

Por otra parte, Kassim (2011) aisló y caracterizó una cepa de *X. campestris* obtenida de hojas de repollo (*Brassica oleracea*) que presentaba lesión necróticas amarillas características de *X. campestris*, en la ciudad de

Mosul (Iraq). Las hojas infectadas fueron cortadas en pequeños trozos, lavadas en 5 ml de agua estéril, y sembradas en agar malta-levadura (MY). Se aislaron colonias con la morfología típica de *Xanthomonas* spp, es decir colonias amarillas, convexas y mucoides, las cuales fueron confirmadas por medio de las pruebas microbiológicas y bioquímicas estándar. Además, el autor evaluó la capacidad de producción de xantano de este aislado, alcanzando los más altos valores de crecimiento y de cantidad de xantano después de 1 y 8 días de incubación, respectivamente. La sacarosa mostró ser la mejor fuente de carbono para la producción de xantano. Cuando el xantano producido fue examinado por cromatografía en capa fina (TLC), mostró estar compuesto por glucosa, manosa y ácido glucourónico, en adición a ácido pirúvico y acético.

Russi *et al.* (2013) caracterizaron a nivel fenotípico y genotípico veinte aislamientos de *Xanthomonas citri* sbsp. *citri* (Xcc), responsables de la forma más severa del cancro cítrico. La identidad bacteriana fue confirmada por anticuerpos específicos, PCR e inoculación. Se evaluó la virulencia en plantas de pomelo y la sensibilidad a antibióticos. A nivel genotípico, las cepas fueron caracterizadas según el perfil plasmídico y las secuencias repetidas ERIC. Todas las cepas resultaron sensibles a estreptomicina y ampicilina, a excepción de la cepa 89.5ex, resistente a ampicilina. En el análisis de virulencia, expresada por el número de pústulas inducidas/cm² de tejido vegetal, se observaron diferencias entre las cepas aunque no es posible agrupar los aislamientos por similitud de virulencia. El aislado 138.2 se destaca por desarrollar mayor cantidad de pústulas en todos los ensayos realizados. En todos los aislados se identificaron tres perfiles plasmídicos, siendo mayoritario el perfil conformado por dos plásmidos, presentes en el 65% de las cepas. La «huella dactilar» obtenida por ERIC es igual en 18 de los aislamientos analizados, aunque dos de ellos presentaron una banda diferencial de 1992 pb. A pesar de las diferencias mencionadas, la población estudiada mostró un alto nivel de homogeneidad, característica ya descrita

para Xcc. Es interesante observar que el aislamiento con mayor virulencia fue el único en el cual se detectaron tres plásmidos.

II.2.-Bases teóricas

II.2.1. *Xanthomonas campestris*: Es una bacteria aciculada, Gram negativa, con un solo flagelo polarizado. Su crecimiento es aeróbico estricto. Las colonias son normalmente amarillas como consecuencia de la producción del pigmento de Xanthomonadina; al añadir glucosa, las colonias se vuelven muy mucoides. Se puede preparar un medio semi-selectivo añadiendo kasugamycina, que inhibe el crecimiento de muchos contaminantes, pero no el de las xanthomonodas. La temperatura máxima de crecimiento está entre 35–39 °C, con un óptimo entre 28-30 °C (Compendium of Citrus Disease, 2007).

La serología, la identificación de bacteriófagos, los perfiles de ácidos grasos, PCR y los análisis de DNA han resultado útiles para la identificación y clasificación de patovares. Sin embargo, cuando no se dispone de estas técnicas, las cepas se pueden distinguir mediante bioensayos de patogenicidad en una gama de huéspedes susceptibles y resistentes. (Compendium of Citrus Disease, 2007). Uno de los productos industrialmente importantes de *X. campestris* es un polisacárido llamado goma xantana (Baird *et al.*, 1983).

Dependiendo de la cepa *X. campestris* es Catalasa positiva, H₂S a partir de peptona, tolerancia máxima al cloruro sódico entre 2 – 5%, tiene un flagelo polar, crecimiento mucoso, esculina positiva, estreptomycin resistente, son bacterias no desnitrificantes y no reducen los nitratos. Existen multitud de cepas ATC 13951, 6465S, NRRL-B 1459 de interés industrial. (Bergey's Manual of determinative Bacteriology 9th, 1994).

Se han descrito tres tipos diferentes de cepas de esta bacteria (Slodki and Cadmus, 1978; Cadmo *et al.*, 1976; Jeanes, 1974).

- Ceba L (Large): presenta colonias mucoides amarillas brillantes, de 4 a 5mm de diámetro. Proporciona buen rendimiento en xantano y con un nivel alto de piruvato (también influye el medio de producción empleado).
- Ceba Sm (Small): colonias mucoides de color amarillo más oscuro que la cepa L y de unos 2mm de diámetro. Proporciona menor rendimiento en xantano que la cepa L y con menos contenido de piruvato.
- Ceba Vs (Very Small): produce colonias no mucoides, de color indefinido y de un diámetro máximo de 1mm. No es frecuentemente productora de xantano.

Parece que las cepas Sm y Vs se producen por degeneración de la cepa L; normalmente debido a un envejecimiento del cultivo, que puede ser acelerado por una conservación deficiente. Por lo tanto, es necesario mantener la bacteria como cepa L, para obtener xantano con buenas propiedades y con un buen rendimiento (Slodki y Cadmus, 1978; Cadmo *et al.*, 1976; Jeanes, 1974).

En 1946, Starr determinó que un medio simple que incluye D-glucosa, cloruro de amonio, buffer fosfato, sulfato de amonio y trazas de otras sales, llena los requerimientos mínimos de crecimiento de *X. campestris*.

II.2.2. *Xanthomonas vesicatoria*: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* es una bacteria Gram negativa biotrófica, y es el agente causal de la enfermedad de manchas en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y pimentón (*Capsicum annuum*) (Jones *et al.*, 1998). También se ha encontrado asociada a otras *Solanaceae*, mayormente hierbas, donde se piensa que actúa de manera accidental, por ejemplo, *Datura* spp., *Hyoscyamus* spp., *Lycium* spp., *Nicotiana rustica*, *Physalis* spp., y *Solanum* spp. (En frutas de patata).

Recientemente, *X. campestris* pv. *vesicatoria* ha sido reclasificada en cuatro especies diferentes: *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas*

euvesicatoria, *Xanthomonas gardneri*, y *Xanthomonas perforans* (Jones *et al.*, 2000). Debido a que la nueva nomenclatura aún está por ser aceptada en la comunidad científica, se sigue usando la nomenclatura clásica *X. vesicatoria* o *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Los síntomas de la enfermedad incluyen defoliación y lesiones necróticas cloróticas en las hojas, frutos y flores, conllevando a la reducción del rendimiento de los cultivos. La enfermedad está presente a nivel mundial, con condiciones óptimas de desarrollo entre 24°C and 30°C y humedad relativa elevada (Jones *et al.*, 2004).

X. vesicatoria es un bacilo Gram negativo, aeróbico, móvil, con un flagelo polar simple. En medios agarizados con dextrosa, las colonias son grandes, en forma de cúpula, levantadas, mucoides, fluidas, de bordes definidos y enteros. Además, es sensible a cloruro de trifetil tetrazolium y es oxidativa.

II.2.3. Polímeros: Son compuestos formados por largas cadenas de carbono, hasta 200.000 por molécula, lo que les confiere alta resistencia a ser degradados, y garantiza que permanezcan en el ambiente por largos periodos de tiempo, incrementando el impacto ambiental negativo. Por lo antes mencionado, ha surgido la necesidad de crear polímeros que sean posibles de sintetizar a partir de recursos renovables, mediante el uso de microorganismos. (Ocampo, 2006).

II.2.4. Biopolímeros: Son compuestos susceptibles a la descomposición primaria a través de la acción enzimática de microorganismos, por lo que son potencialmente biodegradables; y su uso a nivel industrial va desde empaquetado hasta los aditivos alimenticios, y de los productos químicos industriales a los productos farmacéuticos (Ocampo, 2006).

II.2.5. Polisacáridos microbianos: Son una clase particular de biopolímeros, estos son incluidos dentro de la categoría de hidrocoloides o gomas, uno de estos polisacáridos es la goma xantana, la cual es producida comercialmente a partir de la bacteria *X. campestris*. Este biopolímero es ampliamente utilizado en la industria alimenticia, química y farmacéutica, y funciona como un biofloculante, bioabsorbente, agente removedor de metales pesados, entre otros (Prasertsan, 2008).

Los polisacáridos presentan gran cantidad de propiedades útiles para diversas aplicaciones en el sector alimentario, se emplean como agentes estabilizantes, texturizantes y gelificantes (Sanderson y Clarke, 1983). Aunque existen pocos exopolisacáridos aprobados para el uso en alimentación, se encuentran en la elaboración de gelatinas, golosinas y postres de leche, salsas, almibares y rellenos de tarta. Estos compuestos se añaden para el control de la textura del alimento y en la prevención de la formación de cristales de hielo en productos congelados; influyendo en la presentación del producto final comestible. Algunos se emplean como saborizantes, existiendo una relación específica entre el polisacárido presente y el sabor de un alimento (Sutherland, 2001; Nampoothiri *et al.*, 2003).

II.2.6. Goma Xantana: Debido a sus propiedades reológicas, el xantano es un polímero de utilidad para una creciente lista de aplicaciones comerciales, como el textil, la cerámica, la producción agrícola, la producción de alimentos y la recuperación de petróleo. La estructura primaria del xantano es un esqueleto lineal de β -D-glucosas unidas por enlaces (1 $\rightarrow$ 4) (como en la celulosa), con una cadena lateral de trisacárido en la posición C3 de cada glucosa, conteniendo un residuo de ácido glucurónico unido por un enlace (1 $\rightarrow$ 4) a una unidad terminal de manosa, y con un enlace (1 $\rightarrow$ 2) a una segunda unidad de manosa que se conecta con el esqueleto (Figura 1). (Lachke, 2004).

Aunque se ha sugerido que las enzimas extracelulares y el xantano son colectivamente esenciales para la patogenicidad de *X. campestris*, el papel de los factores individuales no son totalmente entendidos (Peluquería *et al.*, 1997). A pesar de que recientemente se ha demostrado una correlación positiva entre una gama de mutaciones genéticas que tienen como resultado la disminución o incapacidad de producir xantano y la reducción de la virulencia en plantas, no está claro si cualquiera de los pasos específicos en el montaje, la decoración o polimerización de unidades de repetición pentasacárido se requieren para la infección de la planta (Chou *et al.*, 1997).

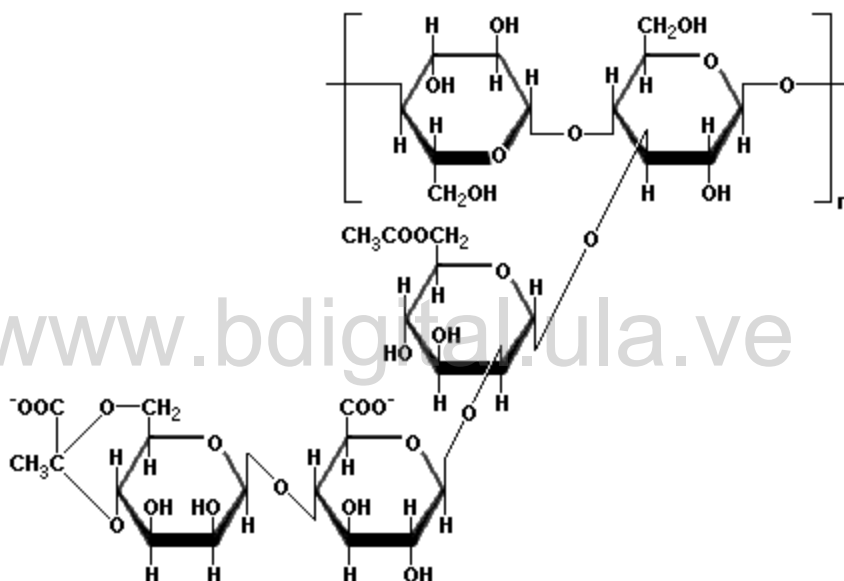


Figura 1. Estructura de la goma xantana.

Según la fuente de obtención, las gomas se pueden clasificar en gomas naturales modificadas o semisintéticas, y sintéticas. Las gomas naturales son las obtenidas a partir de plantas (semillas, algas, cereales, tubérculos), microorganismos (bacterias, hongos) o animales (leche, huesos). Las gomas semisintéticas se pueden obtener también de plantas y microorganismos, pero la molécula obtenida es modificada químicamente. Por último, las gomas obtenidas por síntesis química o gomas sintéticas. (Ripoll, 2009).

II. 3. Antecedentes históricos

La microbiología es la ciencia encargada del estudio de los microorganismos, (de *mikros* “pequeños”, *bios* “vida”, y *logos* “estudio”). Es la rama de la biología dedicada a estudiar los organismos que solo son visibles a través del microscopio, entre ellos los procariotas y eucariotas. La bacteriología tradicional se ha dedicado especialmente a los microorganismos patógenos entre ellas, bacterias, virus y hongos, dejando a otros microorganismos en manos de la parasitología y otras categorías de la biología (Murray *et al.*, 2002).

El término bacteria fue introducido hasta el año 1828 por Christian Gottfried Enrenberg. En 1676 Anton Van Leeuwenhoek, fue el primero en realizar una observación microbiológica. Examinó con sus lentes de microscopio una gota de agua y descubrió un mundo formado por millones de diminutos “animáculos” (Murray *et al.*, 2002).

El primer polisacárido descubierto fue el dextrano en 1940, siendo el primero en comercializarse. El segundo fue la goma xantana, obtenido en el Northern Regional Research Laboratory (NRRL) del departamento de Agricultura de USA, cuando se buscaban alternativas a las gomas de origen vegetal (Jeanes, 1974).

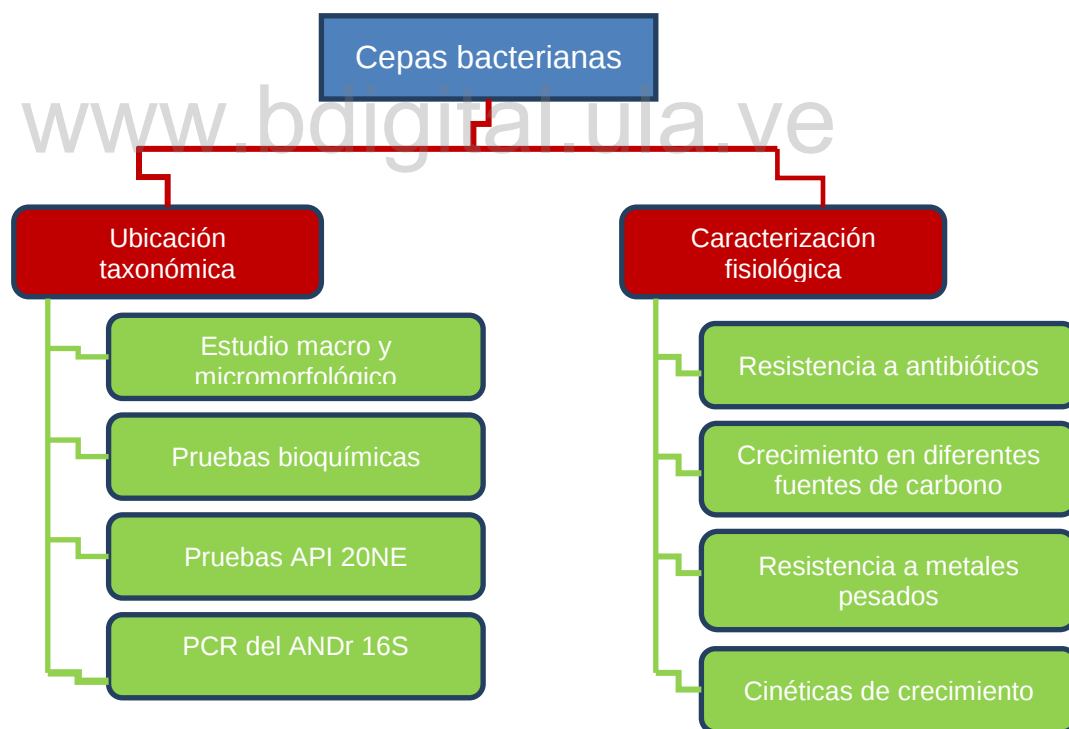
La investigación realizada por el Northern Regional Research Laboratory(NRRL), reveló que la bacteria *X. campestris*, que se encuentran en plantas de repollo, produce un polisacárido de alto peso molecular que protege a la bacteria. Este polisacárido, llamado xantana, ha demostrado tener técnicas y propiedades económicamente interesantes. Su importancia industrial se basa en las cualidades excepcionales como agente reológico de control en sistemas acuosos y como estabilizador de emulsiones y suspensiones (Lachke, 2004). La goma xantana fue el primer biopolímero en ser aprobado en 1969 (Sutherland, 1990). Más del 60% de la producción de xantano de grado alimentario, se emplea en infinidad de productos.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO.

III.1. Diseño de la investigación

El diseño de esta investigación no es experimental porque el estudio se realiza sin la manipulación deliberada de la variable, solamente se observó el fenómeno en su ambiente natural para después analizarlo y los sujetos pertenecen a un grupo o nivel determinado de la variable independiente por autoselección (Hernández *et al.*, 2003). Al mismo tiempo este autor señala que el estudio es transversal porque se recolectan datos con el propósito de describir las variables (Esquema1).



Esquema 1. Diseño de la investigación.

III.2. Población y muestra

La muestra estuvo constituida por 3 aislados bacterianos, obtenidos del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). La información de las cepas estudiadas se presente en la Tabla 1.

Tabla 1. Aislados bacterianos usados en este estudio.

Nombre	Código	Laboratorio de Origen	Planta de aislamiento
<i>X. campestris</i>	2044	Proviene del Laboratorio de Micología (antiguo Laboratorio de Micología y Fermentación), del IVIC	Origen no indicado
<i>X. campestris</i>	2059	Proviene del Laboratorio de Micología (antiguo Laboratorio de Micología y Fermentación), del IVIC - Fac. Agronomía, UCV.	Aislada de frijol
<i>X. vesicatoria</i>	2093	Cátedra de Bacterias Fitopatógenas, Postgrado de Agronomía UCLA, vía Nancy Contreras	Aislada de pimentón

III.3. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

A. Estudio micro y macromorfológico

El procesamiento de las muestras aisladas comenzó con lo que se denomina caracterización bioquímica, la cual abarca dos procesos fundamentales. Un estudio micromorfológico, con la finalidad de: (i) evaluar motilidad y forma de las células (observación en el microscopio óptico), (ii) conocer la naturaleza bioquímica de la pared bacteriana (Tinción de Gram); y

un estudio macromorfológico, que consistió en la observación de las características macroscópicas de las colonias, tales como color, forma, textura y aspecto, así como la producción de pigmentos. Los aislados se cultivaron en agar BHI y sus características macromorfológicas se observaron al cabo de 24 horas de incubación a 30 °C (Koneman *et al.* 1999).

B. Caracterización bioquímica

Con el fin de identificar a los aislados en estudio y lograr una ubicación taxonómica preliminar a nivel de grupo o familia, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Medio de Hugh y Leifson, Reducción de nitratos, MIO (Motilidad, Indol, Ornitina), Prueba de la Oxidasa, así como la siembra en agar MacConkey, evaluando la fermentación de la Lactosa. (Koneman *et al.* 1999, Holt *et al.* 2000).

C. Identificación microbiológica: Pruebas API

Posterior al aislamiento y ejecución de todo el proceso de caracterización bioquímica, se precedió a realizar la identificación microbiológica con la aplicación de las Pruebas API. Básicamente, consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados, adjunta a una base de datos. Este sistema utiliza micro volúmenes de las muestras lo que hace que sea rápido, eficaz y permite realizar numerosas pruebas a la vez. La tira de API contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada uno es una prueba bioquímica distinta. La prueba número 21, la oxidasa, se hace de forma independiente a la tira (Salazar *et al.* 2008). Las pruebas de que consta la galería se reflejan en la Tabla 2.

Tabla 2. Lectura de resultados para batería de pruebas API.

Prueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
VP	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)	Sin color	rosa-rojo
GEL	Gelatinasa	Sin difusión	difusión de pigmento
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa	Azul o verde	Amarillo
MAN	Fermentación/oxidación de manitol	Azul o verde	Amarillo
INO	Fermentación/oxidación de inositol	Azul o verde	Amarillo
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol	Azul o verde	Amarillo
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa	Azul o verde	Amarillo
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa	Azul o verde	Amarillo
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa	Azul o verde	Amarillo
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina	Azul o verde	Amarillo
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa	Azul o verde	Amarillo
OX	Citocromo oxidasa	Sin color	Sin color
ONPG	Beta-galactosidasa	Sin color	Sin color
ADH	Arginina deshidrolasa	Amarillo	Rojo-naranja
LDC	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Rojo-naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo-naranja
CIT	Utilización del citrato	Verde	Azul oscuro o turquesa
H ₂ S	Producción de H ₂ S	Sin precipitado negro	Precipitado negro
URE	Ureasa	Amarillo	Rojo-naranja
TDA	Triptófano desaminasa	Amarillo	Marrón-rojo
IND	Producción de indol	Amarillo	Color rosa o anillo rosa-rojo

Para la realización de estas pruebas se utilizó una colonia aislada del microorganismo. Se preparó una suspensión en 5 mL de solución salina (1% de NaCl) o 5 mL de agua estéril, luego se agregó la suspensión de bacterias llenando los tubos, no la cúpula de todos los pocillos (cada pocillo tiene un tubo y una cúpula, parte aerobia). Se debe llenar la cúpula de los pocillos CIT, VP, GEL con la suspensión de bacterias y cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE, H₂S para obtener anaerobiosis. La tira se le colocó en su propia cámara húmeda de incubación; previamente se agregó agua en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.

Se procedió a incubar a 37 °C durante 18-24 horas y tras la incubación se registraron los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. Sin embargo, otras pruebas requieren ser reveladas, tomando en cuenta dos criterios:

- Si la glucosa da negativo y los tests positivos son dos o menos de dos, no hay que añadir reactivos. Cuando esto ocurre se hacen otros tipos de API como el API20NE, APIOF, el APIM o el API10S para ver determinados metabolismos especiales.
- Si la glucosa es positiva y/o tres o más tests son positivos, se revelan los siguientes test que requieren reactivos: TDA, añadir una gota de FeCl₃ 10%; VP, una gota del reactivo 1 (KOH al 40%) y una gota del reactivo 2 (C₂H₅OH); IND, una gota de reactivo de Kovacs o de Dimetilamino-cinamaldehído; oxidasa, una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.

La lectura de los resultados se llevó a cabo comparando los colores de cada pocillo con los de las tablas de lectura, registrando el resultado como positivo o negativo (Tabla 2). Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total hay 7 grupos de tres tubos o triplete, el test número 21 corresponde al test de la oxidasa (Salazar *et al.* 2008). Para obtener el

perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 ó 4 de acuerdo a los siguientes criterios:

- Si la reacción es negativa se pone 0.
- Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo pocillo, 4 si es el tercer pocillo.
- Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras.

Una vez obtenido el código, se busca en la tabla de identificación la especie por medio de programas informáticos.

D. Identificación molecular: comparación de la secuencia del ADN_r 16S.

Las cepas en estudio se sembraron en medio MLD, para tener cepas frescas para las pruebas de PCR. La identificación molecular consistió en la amplificación del gen ADN_r 16S por medio de PCR, utilizando los primers bacterianos universales 27F (5'AGAGTTTGATC CTGGCTCAG3') (Lane 1991) y 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') (Dekio *et al.* 2005).

Las reacciones de amplificación fueron preparadas para un volumen total de 10µL, conteniendo: 5µL de GoTaq® Green Master mix (Promega), 2µL (0,1µg/µL) de cada primer y 4,6µL de H₂O destilada estéril. Las amplificaciones por PCR se realizaron en un Termociclador Applied Biosystems 2720 con el programa siguiente: lisis bacteriana y desnaturalización a 95°C por 10 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 45s, 51°C por 45s y 72°C por 1.5min por ciclo, y un paso de extensión final por 10min a 72°C (Dekio *et al.* 2005, Batisson *et al.* 2009).

Posteriormente, se llevó a cabo la purificación con sales de los productos de la amplificación, según el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2011), realizándole las siguientes modificaciones: al producto de PCR restante, luego de emplear 3µL para su visualización en el gel de

agarosa, se le agregó H₂O destilada estéril hasta completar un volumen de 100μL. A continuación, se le adicionó un volumen de acetato de amonio 10M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (100% v/v). Esta mezcla se dejó precipitar por 10 min, y se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADN se llevó a 1mL de etanol al 70% v/v dos veces, centrifugando por 10 min y 5 min a 13.4 rcf, respectivamente. Luego se procedió a secar el sedimento (pellet) a temperatura ambiente, y se resuspendió en 11μL de H₂O destilada estéril.

Para la verificación de la presencia y la calidad del ADN luego de la purificación, se procedió a visualizar el producto precipitado ya resuspendido en un gel horizontal de agarosa al 0.8%, con 50ng/ml de bromuro de etidio, cargando 1μL del producto purificado luego de combinarlo con 1μL de buffer de carga 6X, y 4μL de H₂O destilada estéril.

Los productos purificados se enviaron a secuenciar usando el primer *forward* (27F), en MacroGen Inc. (Korea). Posteriormente, con las secuencias obtenidas se generaron *contigs* en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999). Luego se realizó un análisis de similitud entre las secuencias donde se compararon dichos *contigs*, usando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Zhang *et al.* 2000), con las secuencias publicadas en las bases de datos del *GenBank* (el programa *Nucleotide Blast* en <http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>) (Johnson *et al.* 2008).

La identidad bacteriana fue asignada tomando en cuenta los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias con la base de datos, usando como parámetro de identidad “max ident” $\geq 85\%$ (Stackebrandt y Ebers 2006) y una cobertura en el alineamiento de secuencias (“query coverage”) $\geq 98\%$ en el BLAST (Nucleotide Blast) con *Nucleotide collection* dentro del GenBank (NCBI).

E. Estudio preliminar a la resistencia de antibióticos

Una vez concluida la identificación microbiológica y molecular, se procedió a estudiar de manera preliminar la resistencia a los antibióticos. Para ello se prepararon 13 placas del Medio Luria Bertani Duro (MLD). (Sambrook et al.; 1989). (Anexo 1) con antibióticos comprados comercialmente (adquiridos en la farmacia), los cuales se diluyeron hasta obtener una concentración stock de 100 mg/ml. Los antibióticos seleccionados en presentación de comprimidos fueron: Claritromicina 500 mg, Levofloxacin 500 mg, Amoxicilina 500 mg, Cefalotina 1 gr, Cefotaxima 1 gr, Gentamicina 80 mg, Amoxicilina/Ac. Clavulanico 500mg, Cefadroxilo 500 mg, Ciprofloxacina 500 mg, Ampicilina 500 mg y Kanamicina 500 mg; mientras que los de presentación intravenosa fueron Ceftriaxona 1 gr y Cefotaxima 1 gr.

A partir de estas soluciones stock, se prepararon placas de Medio Luria Bertani duro (MLD) (25 ml) con las siguientes concentraciones de cada uno de los antibióticos: 25, 50, 100 y 200 µg/ml. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C para el control de contaminación. Luego se sembraron las cepas por medio de palillos, y se incubaron a 37°C, tomando la lectura a las 24 y 48 h de incubación.

F. Estudio del crecimiento en diferentes fuentes de carbono.

Se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas en estudio en medio YDC (Anexo 1) suplementado con diferentes fuentes de carbono, observando la extensión del crecimiento en los diferentes cuadrantes de la placa de Petri. Los azúcares se colocaron a una concentración final de 0,2 gr/ml, y se ensayaron los siguientes: glucosa, galactosa, sacarosa, arabinosa, xilosa, fructosa, lactosa, maltosa y dextrosa.

G. Estudio de la resistencia a metales pesados.

Se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas en estudio en medio YDC (Anexo 1) suplementado con concentraciones de 2 y 5mM de sulfato de níquel, cloruro de mercurio y sulfato de cobre, observando la extensión del crecimiento en los diferentes cuadrantes de la placa de Petri.

H. Cinéticas de crecimiento en medio líquido.

H.1. Preparación de los inóculos

Las cepas fueron inoculadas con asa de platino a partir de colonias frescas (cultivadas en agar LB). (Sambrook et al.; 1989).en condiciones de esterilidad en 30 mL de caldo LB estéril e incubadas a 30 °C y agitación constante por 12 horas. Los cultivos así obtenidos fueron centrifugados a $5500 \times g$ por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se procedió a realizar dos lavados por cada cepa con sales 1X (Anexo 1), para posteriormente resuspenderlas en sales 1X. Las células así preparadas constituyeron los inóculos para los cultivos posteriores.

H.2.Curvas de crecimiento.

Con el propósito de evaluar el comportamiento de los aislados en estudio con respecto su crecimiento en diferentes medios de cultivo, se realizaron estudios de cinéticas de crecimiento para lo cual se procedió de la siguiente manera: los cultivos se realizaron en fiolas de 250 mL que contenían 100 mL de medio MLD o YDC estéril. (Sambrook et al.; 1989).(Anexo 1). Los inóculos fueron agregados a una concentración de 0,2% (v/v) y los cultivos fueron incubados a 30°C con agitación constante por 24 horas. Cada experimento se realizó por triplicado. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron asépticamente muestras de 1 ml las a las cuales se les realizó lo siguiente, con el objeto de calcular el número de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen (UFC/ml): i) se determinó la

D.O. a 600 nm, y ii) se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de medio MLD.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

IV.1. Ubicación taxonómica de las cepas en estudio

IV.1.1. Estudio micromorfológico y macromorfológico.

El estudio micromorfológico se realizó aplicando la técnica de la coloración de Gram a los microorganismos en estudio. Se encontró que los 3 microorganismos eran bacilos Gram negativos, móviles.

Para el análisis de las características macromorfológicas, las cepas obtenidas de la colección de microorganismos del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos fueron sembradas en medio LB, se determinaron diversas características de las colonias, tales como extensión, forma, tamaño, elevación, borde, densidad, consistencia y color. Los resultados de este estudio se reflejan en la Tabla 3.

Tabla 3. Características macromorfológicas de las cepas sembradas en agar LB.

Muestra	M2044	M2093	M2093
Extensión	A	A	M
Forma	P	P	P
Tamaño	1mm	1mm	1mm
Elevación	E	E	E
Bordes	Et	Et	Et
Densidad	O	O	O
Consistencia	V	V	V
Color	Ac	Ac	Ao

M: Moderado. **A:** Abundante. **P:** Puntiforme. **E:** Elevada. **Et:** Enteros. **O:** Opaca. **V:** Viscosa.
Ao: Amarillo ocre. **Ac:** Amarillo claro.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 3, se hace evidente que las 3 cepas en estudio comparten la mayoría de las características estudiadas, es decir, M2044, M2059 y M2093 poseen forma puntiforme, tamaño de 1mm, elevaciones convexas, bordes enteros, densidad opaca y consistencia viscosa. Las diferencias más importantes son que la cepa M2093 posee una extensión de crecimiento moderado y color amarillo ocre, mientras que M2044 y M2059 presentaron una extensión del crecimiento abundante y color amarillo claro. El hecho de que existan tantas similitudes entre características macromorfológicas y tan pocas diferencias entre las 3 cepas, puede sugerir que los microorganismos en estudio pertenecen a un mismo taxón.

IV.1.2. Caracterización bioquímica.

Las 3 cepas en estudio fueron sometidas a una batería de pruebas bioquímicas (oxidasa, KIA, LIA, citrato, MIO, Indol-Motilidad y úrea) con la finalidad de realizar una ubicación taxonómica preliminar por medio de sus características bioquímicas y fisiológicas. Los resultados obtenidos en cada una de estas pruebas permiten determinar el tipo de galería de pruebas API que debe utilizarse para su identificación microbiológica. Los resultados se pueden apreciar en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas.

PRUEBA MUESTRA	Oxidasa	KIA	LIA	Citrato	M	I	O	I/M	Urea
M2044	Negativo	K/K/-/-	K/K/-/-	Negativo	-	-	-	-/-	-
M2059	Negativo	K/K/-/-	K/K/-/-	Negativo	-	-	-	-/-	-
M2093	Negativo	K/K/-/-	K/K/-/-	Negativo	-	-	-	-/-	-

Los resultados obtenidos en la Tabla 4 indican que los 3 microorganismos son similares bioquímica y fisiológicamente. Inicialmente, los resultados negativos para la prueba de la oxidasa indican que ninguna de las bacterias en estudio posee la enzima citocromo oxidasa. El agar Kligler se emplea con el propósito de determinar la fermentación de los hidratos de carbono (glucosa y lactosa), y determinar la producción de gas y H_2S ; encontrándose que las cepas no fermentan ni lactosa ni glucosa, y no producen gas ni H_2S . Por otra parte, la siembra en agar Lisina-Hierro permite estudiar la desaminación y descarboxilación de la lisina, así como la producción de gas y H_2S , resultando que los microorganismos en estudio no desaminan la lisina, si la descarboxilan, no producen gas ni H_2S (Tabla 4).

Con la finalidad de reconocer si las bacterias son capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono, se aplicó la prueba de utilización del citrato de Simmons, evidenciándose que las 3 cepas no utilizan el citrato como fuente de carbono. En el caso del medio MIO, se evaluó la motilidad, la producción de indol y la capacidad para descarboxilar la ornitina, encontrándose resultados negativos en las tres pruebas para todas las cepas. En el medio Indol-Motilidad se observa que ninguna de las cepas posee la enzima triptofanasa, por lo tanto, ninguna es capaz de degradar el triptófano hasta indol. Finalmente, a través de la prueba de la hidrólisis de la urea, se busca demostrar si las cepas poseen la enzima ureasa, los resultados indican que ninguno de los microorganismos posee dicha enzima (Tabla 4).

Los resultados de las pruebas bioquímicas permiten deducir de modo preliminar que las 3 cepas en estudio no pertenecen a la familia *Enterobacteraceae*.

IV.1.3. Identificación microbiológica: Pruebas API

Luego de obtener los resultados de las pruebas bioquímicas de los diferentes microorganismos, se procedió a aplicar la batería de pruebas API y

así realizar la identificación a nivel de género y especie; usando la prueba API 20NE por ser bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las Enterobacterias. Los resultados de las pruebas API 20NE se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Identificación microbiológica. Resultados pruebas API 20NE.

Muestra	Código API	Identificación bacteriana	Porcentaje de confiabilidad	Concordancia con el manual de Berguey`s
M1	2671205	<i>Xanthomonas campestris</i>	90,4%	24/26
M2	0472341	<i>Xanthomonas campestris</i>	92,7%	23/26
M3	0473300	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	91,5%	24/26

Según los resultados presentados en la Tabla 5, las cepas M2044 y M2059, resultaron ser ambos *Xanthomonas campestris*, y sus características macromorfológicas resultaron ser iguales. El aislado M2093, que compartía una gran cantidad de similitudes con los otros dos aislados, a excepción de algunas características distintivas tales como extensión de crecimiento y color (Tabla 3), fue identificado por medio de la galería API como *X. vesicatoria*.

IV.1.4. Identificación molecular por medio de PCR de ANDr 16S

La identificación molecular se realizó por medio de la comparación de las secuencias del ADN_r 16S de cada uno de los aislados, obtenidos por medio de la amplificación por PCR del gen, utilizando primers universales para el dominio bacteria (27F y 1492R). Una vez obtenidas las secuencias,

las mismas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos GeneBank, utilizando el programa BLAST.

La presencia, calidad y tamaño del ADN amplificado a partir de cada una de las cepas se pudo visualizar mediante el uso de geles de agarosa al 1%, corridos en Buffer TBE 0,5X a 100V. La Figura 2 muestra los resultados de la amplificación y purificación de un fragmento de 1500 pb correspondiente al gen ADNr 16S de las cepas aisladas. Se puede observar la amplificación y purificación de una única banda, lo que indica una buena calidad de la muestra obtenida (Figura 2).

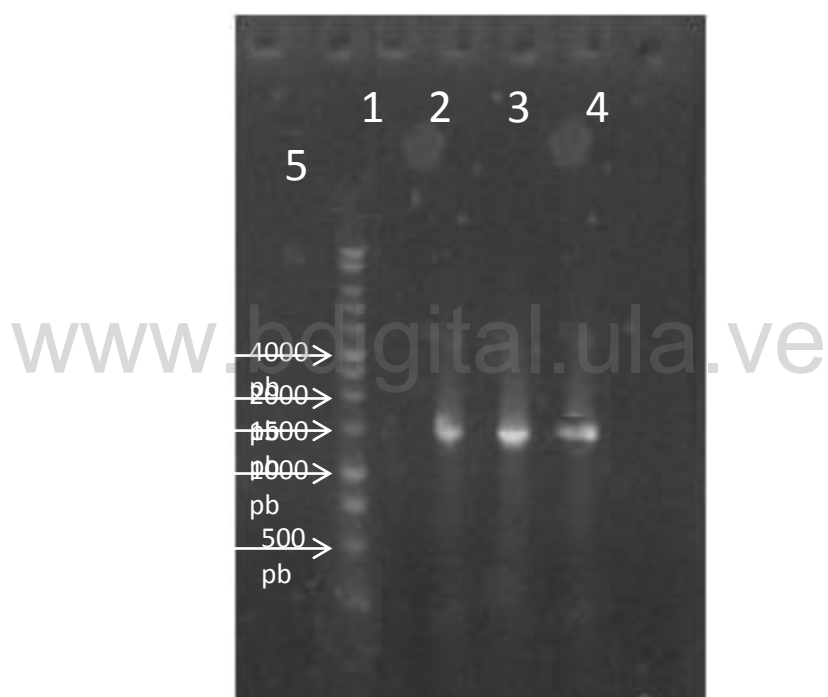


Figura 2. Amplificación por PCR y purificación por precipitación con sales del gen ADNr 16S de las cepas aisladas. 1, escalera de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Promega); 3, cepa M2044; 4, cepa M2059; 5, cepa M2093.

Una vez purificados, los amplificados fueron secuenciados y con la secuencia obtenida se realizó un análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (Sección D de la Metodología). Los resultados de esta comparación se presentan en la

Tabla 6, en la cual se destacan los porcentajes de identidad obtenidos y las especies más cercanas filogenéticamente para cada una de las cepas aisladas.

Se puede observar en la Tabla 6 que las cepas estudiadas fueron identificadas como *X. campestris* (M2044 y M2059) y *X. vesicatoria* (M2093) con porcentajes iguales o superiores al 95%; existiendo una excelente concordancia entre los resultados microbiológicos y moleculares (Tablas 5 y 6).

Tabla 6. Análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen *ADNr 16S* de cada una de las cepas en estudio.

Cepa	Longitud del amplificado	Especies más cercanas filogenéticamente		
		Especie (cepa)	N° de acceso	Porcentaje de identidad
M2044	1000	<i>Xanthomonas campestris</i> cepa IR-Isfahan(B)	KF964554	95
M2059	1000	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> cepa. 8004	NC_007086.1	96
M2093	1000	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> cepa ATCC 35937	NR_026388.1	96

IV.2. Caracterización fisiológica de las cepas en estudio

IV.2.1. Estudio preliminar de la resistencia de antibióticos

Se realizó el estudio preliminar de la resistencia a antibióticos siguiendo la metodología descrita en el Capítulo III, determinando la resistencia a diferentes concentraciones de antibióticos disponibles comercialmente. En la Tabla 7 se presentan los resultados de la resistencia a diferentes antibióticos de los tres aislados identificados en los estudios microbiológicos y moleculares.

Tabla 7. Resultados a nivel de aislado del estudio preliminar de resistencia a antibióticos

CEPA	Betalactámicos	Penicilinas		Cefalosporinas					Aminoglicósidos		Quinolonas		Macrólido
	Ampicilina	Amoxicilina/ Ac. clavulánico	Amoxicilina	Cefalotina	Cefotaxima	Ceftriaxona	Cefadroxilo	Ceftazidima	Kanamicina	Gentamicina	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Clarithromicina
<i>Xanthomonas campestris</i> 2044	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
<i>Xanthomonas campestris</i> 2059	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> 2093	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S

R, resistente; S, susceptible

En líneas generales, las cepas *X. campestris* 2044 y *X. campestris* 2059 resultaron ser sensibles a Amoxicilina-Ácido clavulánico, Ceftazidima, Levofloxacin, Ciprofloxacina y Claritomicina, mientras que resultaron resistentes a ampicilina, amoxicilina, cefalotina, cefotaxima, cefadroxilo, kanamicina, gentamicina, ceftriaxona. Por otra parte, la cepa *X. vesicatoria* resultó ser sensible a todos los antibióticos ensayados, excepto kanamicina.

IV.2.2. Crecimiento en diferentes fuentes de carbono.

Se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas en estudio en medio YDC suplementado con diferentes fuentes de carbono, observando la extensión del crecimiento en los diferentes cuadrantes de la placa de Petri, mostrando los resultados en la Tabla 8.

Tabla 8. Crecimiento de las cepas de *Xanthomonas* en estudio en presencia de diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono (0,2 gr/ml)	<i>X. campestris</i> 2044	<i>X. campestris</i> 2059	<i>X. vesicatoria</i> 2093
Glucosa	++	++	+
Galactosa	++	+	++
Sacarosa	++	+	++
Arabinosa	+	+	+
Xilosa	++	++	+++
Fructosa	+++	++	++
Lactosa	++++	+++	++
Maltosa	++	+++	+++
Dextrosa	++++	++	+

Se evidencia que la fructosa, lactosa, maltosa y dextrosa son azúcares que favorecen mayormente el crecimiento de las tres cepas estudiadas del

género *Xanthomonas*, siendo también la glucosa, galactosa, sacarosa, arabinosa y xilosa fuentes de carbono importantes para su crecimiento, pero en menor proporción. Para *X. campestris* 2044, el crecimiento se ve favorecido en presencia de fructosa, lactosa y dextrosa; mientras que *X. campestris* 2059 crece en mayor proporción al tener disponible lactosa y maltosa como fuentes de carbono. Por otra parte, el crecimiento de *X. vesicatoria* 2093 es mayor cuando se usan la xilosa y la maltosa como fuentes de carbono (Tabla 8).

IV.2.3. Resistencia a diferentes concentraciones de metales pesados

Se determinó la capacidad de desarrollo de las cepas en estudio en medio YDC suplementado con distintos metales pesados, examinando la propagación del crecimiento en los diferentes cuadrantes de la placa de Petri. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Evaluación de la resistencia a metales pesados de las cepas de *Xanthomonas* en estudio.

Metal	Concentración	<i>X. campestris</i> 2044	<i>X. campestris</i> 2059	<i>X. vesicatoria</i> 2093
Sulfato de níquel (NiSO ₄)	2 mM	++	++	++
	5 mM	++	++	--
Cloruro de Mercurio (HgCl ₂)	2 mM	--	--	--
	5 mM	--	--	--
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	2 mM	+++	++	+++
	5 mM	--	--	---

Ninguna de las cepas estudiadas presentó resistencia a cloruro de mercurio. Las cepas *X. campestris* 2044 y *X. campestris* 2059 resultaron ser

resistentes a todas las concentraciones ensayadas de sulfato de níquel, pero solo a 5 mM de sulfato de cobre *X. vesicatoria* resulto resistente. (Tabla 9).

IV.2.4. Cinéticas de crecimiento en medio líquido

Con el propósito de evaluar el comportamiento de las cepas en estudio con respecto a su crecimiento en diferentes medios de cultivo, se realizaron estudios de cinéticas de crecimiento en medio MLD y YCD líquido (Anexo 1). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.

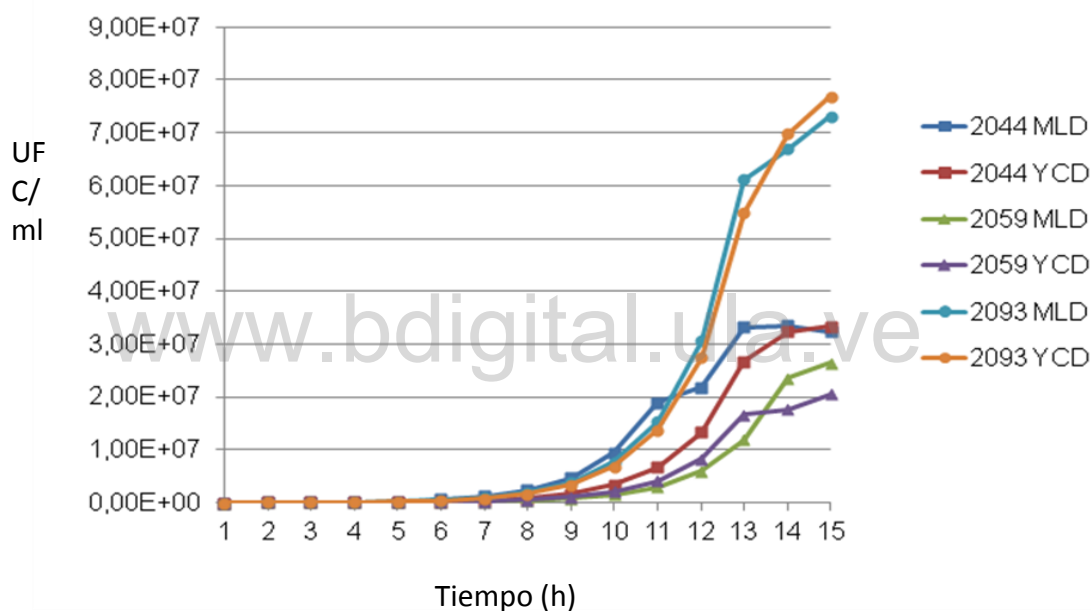


Figura 3- Cinéticas de crecimiento de las cepas de *Xanthomonas* en estudio en medio MLD y YDC.

Es evidente de la Figura 3 que para las tres cepas en estudio no existen diferencias significativas en cuanto al crecimiento en medio MLD o YDC, ya que el crecimiento es similar en ambos medios. Por otra parte, la cepa *X. vesicatoria* 2093 presenta un mayor número de unidades formadoras de colonias y alcanza la fase estacionaria de crecimiento después de 15

horas de cultivo, en comparación de las cepas 2044 y 2059, las cuales alcanzan fase estacionaria pasadas 13 horas de cultivo.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

DISCUSION

V.1. Caracterización bioquímica e identificación microbiológica

Los microorganismos usados en esta investigación fueron obtenidos del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, los cuales estaban interesados en realizar una identificación y caracterización detallada de las mismas.

En lo que se refiere a la morfología macroscópica de cada una de las cepas, realizada en medio LB, se encontró que los 3 microorganismos aislados eran bacilos Gram negativos. Posteriormente, al evaluar las características macromorfológicas, se evidencia que las 3 cepas comparten la mayoría de las características estudiadas, tales como extensión en la placa, forma, tamaño, elevación, bordes, densidad, consistencia y color. Entre las excepciones se encuentran que la cepa M2093 presenta una extensión de crecimiento moderado y color amarillo ocre, mientras que las cepas M2044 y M2059 presentaron una extensión del crecimiento abundante y color amarillo claro (Tabla 3). El hecho de que existan tantas similitudes entre características macromorfológicas, y tan pocas diferencias entre las 3 cepas, puede sugerir que los microorganismos en estudio pertenecen a un mismo taxón, bien sea a una misma familia o a un mismo género (Koneman et al., 1999).

Con el fin de caracterizar la actividad bioquímica y fisiológica de las cepas en estudio, se seleccionaron diferentes pruebas bioquímicas clásicas para la identificación de microorganismos (Holt *et al.*, 2000). Los resultados de dichas pruebas fueron muy semejantes para las tres cepas en estudio (Tabla 4), confirmando que los microorganismos ensayados no pertenecen a la familia *Enterobacteraceae*. Este resultado permitió elegir la prueba

correcta para la identificación microbiológica de estos microorganismos, la API 20NE. Los resultados obtenidos de la galería API permiten identificar a las cepas en estudio como especies del género *Xanthomonas*, siendo las cepas M2044 y M2059 *Xanthomonas campestris*, y la cepa M2093 *Xanthomonas vesicatoria* (Tabla 5).

Además, se realizaron pruebas bioquímicas adicionales, tales como la fermentación de la lactosa y glucosa, motilidad, producción de indol, descarboxilación de la ornitina y la prueba de la oxidasa, las cuales se utilizan para estudiar la actividad bioquímica y fisiológica de bacilos Gram negativos, facilitando su ubicación taxonómica (Holt *et al.*, 2000). Desde la realización de los estudios macro y micromorfológicos y las pruebas bioquímicas, era evidente que las tres cepas en estudio pertenecían al mismo taxón, posiblemente al mismo género, pero que las cepas M2044 y M2059 se diferenciaban de la cepa M2093 en características morfológicas y fisiológicas, posiblemente porque eran de diferentes especies (Tablas 3 y 4). Esta especulación se confirma con los resultados obtenidos en la pruebas API, evidenciándose la excelente concordancia encontrada entre los resultados de los estudios macro y micromorfológicos, pruebas bioquímicas y pruebas API.

Por otra parte, el Manual de Bergeys de Determinación Microbiológica elaborado por Holt *et al.* (2000), resalta que la gran variedad de bacilos Gram negativos se pueden dividir en cuatro familias tradicionales, como lo son *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae* y *Xanthomonadaceae*. Al comparar los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas con los reportados en el Manual de Bergey's de Determinación Microbiológica, se obtiene que las cepas agrupadas anteriormente como bacilos Gram negativos no fermentadores pertenecen a la familia *Xanthomonadaceae*.

Los resultados encontrados en este trabajo se corresponden con los reportados por Hernández y Trujillo (2000), quienes colectaron muestras foliares de plantas de cuarentona provenientes de algunas localidades del

estado Aragua (Venezuela), cuyas hojas presentaban manchas necróticas abundantes de 1-20 mm de diámetro o más, con un margen clorótico sobre la mayor parte del follaje. De las hojas con los síntomas descritos se aisló consistentemente una bacteria, la cual fue sometida análisis macro y micromorfológicos y pruebas bioquímicas. Los autores reportaron que las colonias eran de color amarillo pálido con un tamaño de 1-2 mm de diámetro, redondas, elevadas, lisas, brillantes y traslúcidas. Además, los aislamientos presentaron forma de bastón, fueron Gram negativos, estrictamente aeróbicos, Catalasa y Oxidasa positivos, hidrolizaron el almidón y licuaron la gelatina, produjeron H₂S, toleraron hasta 2% de NaCl, proteolizaron la leche, fueron fosfatasa positivos, y la producción de indol y acetoin fue negativa. Todas estas características fueron típicas para el género *Xanthomonas*.

De igual forma, Alvez *et al.* (2011) sometieron a cepas aisladas a partir de plantas de caña de azúcar a análisis fenotípicos, evaluando características como extensión del extendido, forma, tamaño, elevación, borde, densidad, consistencia y color. Los autores encontraron que las colonias presentaron un diámetro entre 1 y 2 mm, forma circular, elevación convexa, borde entero y color amarillo, indicando que los aislados pertenecían al género *Xanthomonas*.

V.2. Identificación molecular por medio de la comparación de la secuencia del gen *ADNr 16S* obtenido por PCR

Para verificar y complementar los resultados obtenidos con la identificación microbiológica, se realizó la identificación molecular de las cepas en estudio por medio del análisis comparativo de la secuencia del gen *ADNr 16S* obtenido por medio de amplificación por medio de la técnica de PCR. Este tipo de análisis proporciona una valiosa identificación bacteriana a nivel de especie, sobrellevando los inconvenientes más comunes encontrados en la identificación microbiológica (Cheng *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias del gen *ADNr 16S* de los bacilos Gram negativos, identificados previamente como *Xanthomonas* por medio de análisis microbiológicos, permiten identificar como *X. campestris* a las cepas M2044 y M2059, y como *X. vesicatoria* a la cepas M2093, con porcentajes de homología superiores al 95% (Tabla 6). Es importante destacar la excelente concordancia existente entre los resultados de las pruebas microbiológicas y moleculares (Tablas 5 y 6).

Hauben *et al.* (1997) realizaron la comparación de las secuencias del ADN ribosomal 16S de todas las especies de *Xanthomonas*, con el objetivo de evaluar la variabilidad interespecífica dentro de este género y establecer las relaciones filogenéticas de las especies de *Xanthomonas*. En primer lugar, los autores demostraron que las especies del género *Xanthomonas* se agrupan en la subdivisión gamma de las proteobacterias. Por otra parte, las especies del género *Xanthomonas* exhibieron altos niveles de similitud de secuencias, teniendo máximos valores de 98,2%, los cuales corresponde a un promedio de 14 diferencias en nucleótidos. El análisis permitió separar a las especies del género *Xanthomonas* en tres grupos taxonómicos. Debido a la muy restringida variabilidad en cuanto a características morfológicas y bioquímicas de las cepas de *Xanthomonas*, las diferencias encontradas en la secuencia del gen *ADNr 16S* podrían tener un valor diagnóstico, permitiendo diferenciar entre las mismas.

Aunque la comparación de las secuencias del *ADNr 16S* ha sido utilizada ampliamente para la identificación y clasificación de bacterias, debido a lo homogéneo que es el género *Xanthomonas*, esta técnica no ha resultado suficiente para diferenciar correctamente entre las diferentes especies, lo que se ha traducido en la persistencia de problemas taxonómicos en este grupo. Es por lo antes mencionado, que se han desarrollado técnicas alternativas que colaboren con la identificación de las especies del género *Xanthomonas*.

En este sentido, Rademaker *et al.* (2000) evaluaron la variabilidad del género *Xanthomonas* por medio de la técnica de la huella dactilar del ADN basada en PCR, usando la evaluación de las secuencias repetidas de PCR y AFLP, por medio de estudios de hibridación de ADN-ADN. Para ello se usaron 3 grupos de primers, rep-PCR, para evaluar los patrones de amplificación generados por 178 cepas de *Xanthomonas*. Adicionalmente, se realizaron los perfiles de AFLP de 80 cepas de *Xanthomonas*. Los patrones generados por los estudios de rep-PCR y AFLP fueron comparados, y se observó una alta correlación entre los mismos, sugiriendo que esta estrategia revela las relaciones fenotípicas y filogenéticas entre los microorganismos.

Por otra parte, Goncalves y Rosato (2002) determinaron la relación filogenética de 17 especies de *Xanthomonas* por medio del análisis de la secuencia del espaciador intergénico 16S-23S ADN_r, espaciador ITS. Los autores encontraron que esta secuencia intergénica varía en tamaño de 492 a 578 nucleótidos, y la similitud entre estas secuencias dentro del género *Xanthomonas* varía entre 63 a 99%. Los autores proponen que existen suficientes diferencias en esta secuencia intergénica en las especies del género *Xanthomonas* como para usar el análisis de esta secuencia para la diferenciación entre especies.

Incluso, se han desarrollado herramientas que permitan la identificación de una especie en particular, técnicas diferentes a la amplificación y secuenciación del ADN_r 16S. Por ejemplo, Cubero y Graham (2002) utilizaron el análisis de la secuencia del gen *pthA*, involucrado en la virulencia de especies de *Xanthomonas* causantes del cancro bacterial de los cítricos.

V.3. Caracterización fisiológica de las cepas de *Xanthomonas* identificadas

V.3.1. Resistencia a antibióticos

En líneas generales, las cepas *X. campestris* 2044 y *X. campestris* 2059 resultaron ser sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, ceftazidima, levofloxacin, ciprofloxacina y claritomicina, mientras que resultaron resistentes a ampicilina, amoxicilina, cefalotina, cefotaxima, cefadroxilo, kanamicina, gentamicina y ceftriaxona. Por otra parte, la cepa *X. vesicatoria* 2093 resultó ser sensible a todos los antibióticos ensayados, excepto kanamicina (Tabla 7).

Se ha estudiado la resistencia de cepas de *Xanthomonas* a antibióticos como la ampicilina y estreptomycin. Por ejemplo, Weng *et al.* (2004) amplificaron, secuenciaron y analizaron la expresión del gen *blaXCC-1* en *X. campestris* pv. *campestris*, el cual codifica para la proteína AmpR1, conocida como una β -lactamasa, la cual confiere resistencia a la ampicilina. La proteína AmpR1 deducida de este gen mostró una identidad significativa en cuanto a la secuencia de aminoácidos y motivos conservados con las proteínas AmpR de otras especies, por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa* (58,2% de identidad en secuencia de aminoácidos). Adicionalmente, mediante estudios de expresión, se demostró que la expresión de esta β -lactamasa es constitutiva en este aislado. En este mismo orden Russi *et al.* (2013) evaluaron la resistencia de diversos aislados de *X. citri* pv. *citri* a ampicilina y estreptomycin, encontrando que todos los aislados fueron sensibles a estreptomycin y resistentes a ampicilina.

Xu *et al.* (2013) evaluaron en cuatro aislados resistentes a estreptomycin de *X. oryzae* pv. *oryzae*, la presencia de los integrones de clase 1, 2 y 3 y de los genes *aadA1* y *aadA2*, los cuales confieren resistencia a estreptomycin y espectomicina. Se logró demostrar que la presencia de

estos genes confiere además resistencia a tobramicina, kanamicina, gentamicina y rifampicina.

Como se puede observar en la Tabla 7, las cepas de *X. campestris* 2044 y *X. campestris* 2059 resultaron ser resistentes a múltiples antibióticos. En *Escherichia coli* se encuentra presente el regulador MarR, el cual se cree que es un factor clave en la regulación del operón *marRAB*, responsable del fenotipo *mar*, cuya característica principal es la resistencia a una amplia variedad de antibióticos estructuralmente diferentes y medicamente importantes. Chin *et al.* (2006) cristalizaron una proteína putativa perteneciente a la familia MarR, denominada XC1739, del patógeno de plantas *X. campestris*, y determinaron su estructura a una resolución de 1.8 Å. Los autores reportan que esta proteína comparte un 32% de identidad (55,6% de similitud) con la proteína MarR de *E. coli*. Estos resultados, junto con la similitud en estructura de XC1739 con la proteína MarR de *E. coli*, sugieren que XC1739 es un regulador transcripcional de la familia MarR, lo cual podría conferirle múltiple resistencia a antibióticos a *X. campestris*.

V.3.2. Crecimiento de las cepas de *Xanthomonas* en diferentes fuentes de carbono.

Al evaluar el crecimiento de las cepas de *Xanthomonas* en diferentes fuentes de carbono, se encontró que *X. campestris* 2044 crece en mayor proporción en presencia de fructosa, lactosa y dextrosa; mientras que *X. campestris* 2059 se desarrolla en una importante proporción al tener disponible lactosa y maltosa como fuentes de carbono. Por otra parte, el crecimiento de *X. vesicatoria* 2093 es mayor cuando se usan la xilosa y la maltosa como fuentes de carbono (Tabla 8).

Se ha demostrado que la utilización de una fuente de carbono por parte de una cepa bacteriana depende de la cepa y no del género o especie (Koneman *et al.*, 1999). Por ejemplo, Zapata y Gaud (2001) evaluaron el crecimiento de aislados identificados como *X. campestris* pv. *phaseoli* en

diferentes fuentes de carbono, encontrando que todos los aislados fueron capaces de crecer en presencia de glucosa, manosa, galactosa, celobiosa y fructosa, y no en presencia de arabinosa. En este mismo trabajo, el aislado identificado como *X. campestris* fue capaz de crecer en presencia de todas las fuentes de carbono ensayadas; mientras que el aislado identificado como *X. axonopodis* solo creció en presencia de glucosa y fructosa.

Otro ejemplo lo constituye el trabajo realizado por Kassim (2011) quien evaluó el efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de goma xantano y biomasa en un aislado bacteriano local obtenido a partir de hojas de repollo infectadas con la mancha negra, e identificado por medio de pruebas bioquímicas como *X. campestris*. Se encontró que la mayor producción de biomasa ocurría cuando se usaba como fuente de carbono sacarosa, manosa y celobiosa (entre 2,2 y 2,6 g/l), mientras que la producción era intermedia usando glucosa, fructosa, galactosa y lactosa (entre 1,4 y 1,9 g/l). Por otra parte, la biomasa era inferior a 1 g/l cuando se usaron como fuentes de carbono xilosa y ramnosa.

V.3.3. Resistencia a diferentes concentraciones de metales pesados.

Al evaluar la resistencia de estos aislados ambientales a diferentes concentraciones de metales pesados, se pudo observar que ninguna mostró resistencia a cloruro de mercurio. Por otra parte, las cepas *X. campestris* 2044 y *X. campestris* 2059 manifestaron ser resistentes a todas las concentraciones ensayadas de sulfato de níquel, pero solo a 2 mM de sulfato de cobre. Por último, *X. vesicatoria* 2093 fue resistente a 2 mM de sulfato de níquel y sulfato de cobre, pero no a la concentración de 5 mM de cada metal (Tabla 9).

Con respecto a la resistencia al sulfato de cobre, Carrillo *et al.* (2001) evaluaron la resistencia a diferentes formulaciones de cobre de 39 aislados bacterianos obtenidos a partir de hojas, frutos y tallos de plantas de tomate

que presentaron los síntomas típicos de la enfermedad de la mancha bacteriana ocasionada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Se encontró que el 48,7% de las cepas ensayadas presentaron resistencia a productos a base de cobre, por lo que se concluye existen cepas de *X. campestris* pv. *Vesicatoria* resistentes a este metal, lo que hace más difícil su control por medio de este metal. Basim *et al.* (2005) caracterizaron los genes de resistencia a cobre en la cepa XvP26 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* aislada originalmente a partir de plantas de pimentón de Taiwan. Encontraron que los genes de resistencia a cobre se localizaron en la región de 7.652 pb, la cual se encontraba localizada en el cromosoma. Estos genes hibridaron débilmente con otros genes de resistencia a cobre de *Xanthomonas* y *Pseudomonas*. Los genes de resistencia a cobre están constituidos por 4 fragmentos abiertos de lectura (ORF), cuyas secuencias de aminoácidos putativas corresponden con genes de resistencia a cobre reportados previamente.

Por otra parte, Voloudakis *et al.* (2005) identificaron la presencia de genes de resistencia a cobre en *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, presentes en plásmidos y relacionados con los operones *cop* y *pco* de *Pseudomonas syringae* y *Escherichia coli*, respectivamente. Además, Behlau *et al.* (2013) caracterizaron los genes de resistencia a cobre en *X. citri* subsp. *citri* de Argentina y *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* de Florida, y la compararon con genes de otras especies bacterianas resistentes a cobre. Fueron identificados ORF relacionados con los genes , *copA*, *copB*, *copM*, *copG*, *copC*, *copD* y *copF* en *X. citri* subsp. *citri* A44. Los mismos ORFs, excepto *copC* y *copD*, fueron identifiacados en *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* 1381.

Por último, Behlau *et al.* (2011) compararon los genes de resistencia a cobre de *X. citri* subsp. *citri* de Argentina y *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* de Florida, con 12 especies de *Xanthomonas* de diferentes ubicaciones geográficas, llegando a la conclusión de que los plásmidos que portan los genes de resistencia a cobre han sido transferidos horizontalmente, sufriendo

mutaciones dependientes de la presión selectiva propia de cada ubicación geográfica. Aunque la alta homología existente en los genes de resistencia a cobre (CuR) entre las especies de *Xanthomonas* podría sugerir un origen común, las pequeñas diferencias en las secuencias de nucleótidos indican que los genes CuR han sido intercambiados independientemente entre especies de *Xanthomonas* a lo largo del mundo.

Es importante destacar que no existen reportes en la literatura en los que se haya evaluado la resistencia de cepas de *Xanthomonas* a metales como níquel y mercurio, siendo este trabajo el primer reporte de cepas de *X. campestris* y *X. vesicatoria* resistentes a níquel (Tabla 9).

V.3.4. Cinéticas de crecimiento de cepas de *Xanthomonas* en medio líquido.

De las curvas de crecimiento de las cepas de *Xanthomonas* en estudio, se evidencia que las cepas crecen en iguales condiciones usando los medios LB y YDC. Sin embargo, *X. vesicatoria* 2093 posee un mayor número de unidades de formadoras de colonias que las cepas 2044 y 2059 de *X. campestris* (Figura 3).

Zuleta *et al.* (2002) realizaron curvas de crecimiento de *X. campestris* aislada de *Brachiaria* spp. en caldo nutritivo. Encontraron que la fase exponencial del crecimiento comienza después de transcurridas 4 horas de cultivo, alcanzando fase estacionaria después de 9 horas de cultivo. Por otra parte, Ripoll (2009) realizó curvas de crecimiento de *X. campestris* en diferentes medios de cultivo a 30 °C, encontrando un crecimiento rápido en medio lactosuero tratado con β -galactosidasa. Aunque el crecimiento en lactosuero tratado fue menor en comparación con el crecimiento en medio YM o “ideal”, presentó un crecimiento considerable y bastante rápido, alcanzándose a las 12 horas de incubación en medio lactosuero una concentración de 0,24 g/l en biomasa, en comparación con 0,35 g/l en medio YM.

CONCLUSIONES

1. Se encontró que los 3 microorganismos aislados eran bacilos Gram negativos, que comparten la mayoría de las características estudiadas, tales como extensión en la placa, forma, tamaño, elevación, bordes, densidad, consistencia y color.
2. Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron muy semejantes para las tres cepas en estudio, confirmado que los microorganismos ensayados no pertenecen a la familia *Enterobacteraceae*.
3. Los resultados obtenidos de la galería API permiten identificar a las cepas en estudio como especies del género *Xanthomonas*, siendo las cepas M2044 y M2059 *Xanthomonas campestris*, y la cepas M2093 *Xanthomonas vesicatoria*.
4. Los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias del gen *ADNr 16S* de los bacilos gram negativos, identificados previamente como *Xanthomonas* por medio de análisis microbiológicos, permiten identificar como *X. campestris* a las cepas M2044 y M2059, y como *X. vesicatoria* a la cepas M2093, con porcentajes de homología superiores al 95%.
5. Las cepas *X. campestris* 2044 y *X. campestris* 2059 resultaron ser sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, ceftazidima, levofloxacina, ciprofloxacina y claritomicina, mientras que resultaron resistentes a ampicilina, amoxicilina, cefalotina, cefotaxima, cefadroxilo, kanamicina, gentamicina y ceftriaxona. Por otra parte, la cepa *X. vesicatoria* 2093 resultó ser sensible a todos los antibióticos ensayados, excepto kanamicina.
6. Se encontró que *X. campestris* 2044 crece en mayor proporción en presencia de fructosa, lactosa y dextrosa; mientras que *X. campestris* 2059 de desarrolla en una importante proporción al tener disponible

lactosa y maltosa como fuentes de carbono. Por otra parte, el crecimiento de *X. vesicatoria* 2093 es mayor cuando se usan la xilosa y la maltosa como fuentes de carbono.

7. Ninguna de las cepas en estudio mostró resistencia a cloruro de mercurio. Por otra parte, las cepas *X. campestris* 2044 y *X. campestris* 2059 manifestaron ser resistentes a todas las concentraciones ensayadas de sulfato de níquel, pero solo a 2 mM de sulfato de cobre. Por último, *X. vesicatoria* 2093 fue resistente a 2 mM de sulfato de níquel y sulfato de cobre, pero no a la concentración de 5 mM de ambos metales.
8. Las tres cepas en estudio crecen en iguales condiciones usando los medios LB y YDC. Sin embargo, *X. vesicatoria* 2093 posee un mayor número de unidades de formadoras de colonias que las cepas 2044 y 2059 de *X. campestris*.

www.bdigital.ula.ve

RECOMENDACIONES

Este trabajo es el comienzo de una línea de investigación muy interesante y de amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas, es por ello que para continuar con la caracterización de los microorganismos se recomienda:

1. Evaluar la resistencia a otros metales pesados como el zinc, cobalto, entre otros.
2. Evaluar la resistencia de estas cepas de *Xanthomonas* a diferentes concentraciones de cloruro de sodio.
3. Evaluar la capacidad de producción de goma xantana.
4. Evaluar las propiedades reológicas de la goma xantana producida, en caso de que la produzcan.
5. Ensayar con medios de cultivo alternativos que puedan ser utilizados para la producción de goma xantana, de modo que se produzca mayor cantidad, mayor calidad y que disminuyan los costos de producción.
6. De modo de caracterizar a nivel molecular la producción de goma xantana, amplificar, secuenciar y analizar en estas cepas los genes del operón Gum, responsables de la producción de goma xantana.

REFERENCIAS

- Alvez, B.; Carballo, J.; Alonso, G. y Oropeza, M. (2011). Diagnóstico molecular de *Xanthomonas albilineans* (ashby) dowson en Venezuela, agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. *Agronomía tropical Venezuela*, 61 (1), 27-36.
- Arnold, D.; Pitman, A. and Jackson, R.(2003). *Pathogenicity and other genomic islands in plant pathogenic bacteria* (4º ed.). New York.
- Azuaje, R.; (1999) .Producción de xantano por *Xanthomonas campestris* en un medio de cultivo no convencional. Mérida, (tesis de pre grado); Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias.
- Baird, J.; Sandford, P. y Cottrell I. (1983). Microbiana nuevas aplicaciones de tecnología de algunos polisacáridos. *Bio Industrial*; (1): 778 – 783.
- Basim, H.; Minsavage, G.; Stall, Robert.; Wang, J.; Shanker, S. and Jones, Jeffrey.(2005). Characterization of a unique chromosomal copper resistance Gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *American Society for Microbiology*, 71, (12), 284- 8291.
- Batissou, I.; Crouzet, O.; Besse- Hoggan, P.; Sancelme, M.; Mangot, J.; Mallet, C.; Bohatier, J. (2009). Isolation and characterization of mesotrione- degrading *Bacillus* sp. From soil. *Environmental pollution*. 157,1195-1201.

- Behlau, F.; Canteros, B.; Minsavage, G.; Jones, J. and Graham, J. (2011). Molecular Characterization of Copper Resistance Genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfa* subsp *Citrumelonis*. *American Society for Microbiology*, 77 (12), 4089-4096.
- Behlau, F.; Hong, J.; Jones, J. and Graham, J. (2013). Evidence for Acquisition of Copper Resistance Genes from Different Sources in Citrus-Associated Xanthomonads. *The American Phytopathological Society*, 103 (5), 409-418.
- Bergey's Manual of determinative Bacteriology 9th, 1994.
- Borges, C.; Vendruscolo, C. and Biosci, J. (2007). Anthranic acid synthesized by strains of *xanthomonas campestris* pv *pruni*: production, viscosity and chemical composition. 23 (4), 67-73.
- Burger, A. and Eichenlaub, R. (2003). *Genetics of phytopathogenic bacteria*. Progress in botany. Berlin. New York.
- Cadmo, M., Rogovin, S., Burton, K., Pittsley, J., Knutson, C., y Jeanes, A. (1976). Variación Colonial de *Xanthomonas campestris* en NRRL B-1459 y la caracterización del polisacárido de una cepa variante. *Can. J. Microbiol* ; (22): 942 – 948.
- Carrillo, F.; Sánchez, B.; Raymundo, S.; Raúl, A. y Márquez, I. (2001). Razas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. presentes en el estado de Sinaloa México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 248-250.

- Cheng, J.; Huang, C.; Lin, C.; Chen, C.; Chang, Y.; Chang, S. and Tseng, C (2006). Rapid Detection and Identification of Clinically Important Bacteria by High-Resolution Melting Analysis after Broad- Range Ribosomal RNA Real-Time PCR. *Clinical Chemistry*. 52:11. 1997-2004.
- Chin, K.; Tu, Z.; Li, J.; Chou, Ch.; Wang, A. and Chou, S. (2006). The Crystal Structure of XC1739: A Putative Multiple Antibiotic-Resistance Repressor (MarR) from *Xanthomonas campestris* at 1.8 Å Resolution. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 65,239–242.
- Chou, F., Chou, H., Lin, Y., Yang, L., Lin, N., Weng, S., y Tseng. (1997). Albergue *Xanthomonas campestris* gomaD gen necesario para la síntesis de goma xantano está implicado en la pigmentación normal y la virulencia en la causa de la putrefacción negro. *Biochem Biophys. Res. Commun.* (233),265 – 269.
- Compendium of Citrus Disease, Grupo Mundi-Prensa, Second Edition, the American Phytopathological Society; St. Paul, MN USA. 2007; p. 55121.
- Cubero, J. and Graham, J. (2002). Genetic Relationship among Worldwide Strains of *Xanthomonas* Causing Canker in Citrus Species and Design of New Primers for Their Identification by PCR. *Applied and environmental microbiology*, 68 (3), 1257–1264.
- Dekio, I.; Hayashi, H.; Sakamoto, M.; Kitahara, M.; Nishikawa, T.; Suematsu, M.; Benno, Y. (2005).Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture independent molecular profiling. *Journal of Medical Microbiology*,54, 1231-1238.

- Escalona, Y.; Contreras, N.(2011). Primer reporte de la mancha bacteriana en parchita (*passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa*) en Venezuela. *Revista de Bioagronomía*,23(1),69-75.
- Escalona, Y.; Rincon, N. (2011). Enfermedades bacterianas diagnosticadas en el laboratorio de bacteriología-ucla durante el 2010. *Revista de fitopatología Venezuela*, 24(2), 60-97.
- Gent, D.; Schwartz, H.; Ishimaru, C.; Louws, F.; Cramer, R. and Lawrence, C.(2004). Polyphasic Characterization of *Xanthomonas* Strains from Onion, 94(2). 184-195.
- Gilani, S.; Najafpour, G.; Heydarzadeh, H. and Zare, H.(2011). Kinetic models for xanthan gum Production using *Xanthomonas Campestris* from molasses. *Chemical Engineering Quarterly* ,17(2), 179–187.
- Goncalves, E. and Rosato, Y. (2002). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S–23S rDNA intergenic spacer sequences.*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 355-361.
- Guevara, Y. y Maselli, A. (2005). Bacteriosis en cilantro (*Coriandrum sativum* L.) causada por *Xanthomonas campestris* en Venezuela. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 97-100.
- Guevara, Y. y Maselli, A. (1999). El tizón bacteriano del arroz en Venezuela. *Revista de agronomía tropical*, 49(4), 505-516.

Guevara, Y. y Debrot, E. (1984). Tizon bacteriano de la cala (*anthurium andreanum lind*) en Venezuela. *Revista de agronomia tropical*, 34(4-6),153-160.

Hauben, L.; Vauterin, J.; Swings, J. and Moore, E. (1997). Comparison of 16s ribosomal dna sequences of all *Xanthomonas* species. *International journal of systematic bacteriology*, 47(2), 328-335.

Hernandez, R.; Fernandez, C. y Baptista, P.(2003). Metodología de la investigación. Editorial McGrawHill. D.F, Mexico.

Hernández, Y. y Trujillo, G. (2000). *Xanthomonas campestris pv. zinniae*, infectando plantas de cuarentona (*Zinnia elegans* Jacq.) en Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*, (17) ,156-163.

Holt, J., Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J.; Williams, S. Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. 9na Edicion. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. USA. 2000.

<http://www.ine.gov.ve/>, junio 06, 2014.

Jeanes, A. (1974). Extracellular microbial polysaccharides. *Food technology*. (28): 34 – 40.

Jiménez, O.; Contreras, N. y Nass, H. (2004). *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la Caña de Azúcar (*Saccharum* sp) en los estados Lara y Yaracuy. *Revista de la facultad de agronomía*.21 (3).

- Johnson, M.; Zaretskaya, I.; Raytselis, Y.; Merezhuk, Y.; McGinnis, S.; Madden, T.(2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36:W5-W9.
- Jones, B., Lacy, G.; Bouzar, H.; Stall, R. and Schaad, N.(2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Jornal Microbiology*, 27,755-762.
- Jones, J., Bouzar, H.; Stall, E.; Almira, E.; Roberts, P.; Bowen, B.; Sudberry, J.; Strickler, M. and Chun, J. (2000). Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. associated with pepper and tomato lesions. *Journal Microbiology*, 50,1211-1219.
- Jones, J.; Stall, R. and Bouzar, H.(1988). Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Journal Phytopathology*, 36, 41-58.
- Kalogiannis, S.; Liakovidou, G. and Liakopoulou, M. (2003), Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses; *Process Biochemistry* (39),249.
- Kassim, M. (2011). Production and characterization of the polysaccharide xanthan gum by a local isolate of the bacterium *Xanthomonas campestris*. *African Journal of Biotechnology*, 10(74), 16924-16928.
- Kimati, H.; Bergamin, F. and Amorim, L.(1995). *Handbook of Plant Pathology principles and fetuses* (3^o ed.). Sao Paulo.

Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P. y Winn, W. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas de color. 5ta edición- editorial Panamericana. México.

Lachke, A. Xanthan a versatile gum. (2004). *Resonance*, 9 (10), 25-33.

Lane, D. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. Pp.115-176. In Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (Eds): Nucleic acid techniques in bacterial systematics John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.

Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G. y Pfaller M. Microbiología Médica. Cuarta Edición. España: EdiDe, S.L.; 2002.

Nalimova, M.; Peña, S. y Coronado, M. (2005). Efecto in vitro de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xanthomonas*. *Revista de Fitosanidad*, 9(3).

Nampoothiri, K., Singhanian, R., Sabarinath, C. and Pandey, A. (2003). Fermentive production of gellan using *Sphingomonas Paucimobilis*. *Process Biochemistry*. (38), 1513 – 1519.

Nigam, P.; Robinson, T.; McMullan, G. y Marchant, R. (2001). Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative. *Biores Technol*, 77, 247-255.

Ocampo, C. (2006). Ensayos para la producción de pha enfocado a la industria textil. Medellín, (trabajo de grado) UPB. Facultad de Ingeniería Química.

- Peluquería, C., Tang, J., el Feng, J., Pan, M., Wilson, T, Slater, H., Dow, J., y col. (1997). Un nuevo sistema de reglamentación necesaria para la patogenicidad de *Xanthomonas campestris* es mediada por una molécula pequeña señal difusible. *Mol. Microbiol.* (24),555 – 566.
- Polanco, C. La pústula bacteriana de la soya en Venezuela. (1974). *Revista de agronomía tropical*, 24 (4), 279-287.
- Prasertsan, P. Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers*. 2008; (71): 468.
- Rademaker, J.; Hoste , B.; Louws, F.; Kersters, K.; Swings, J.; Vauterin, L.; Vauterin, P. and de Bruijn, F. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA–DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (50), 665-677.
- Ripoll, X. (2009). Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeatos. Granada, (tesis doctoral). Universidad de Granada. Facultad de Farmacia.
- Ryan, R.; Vorholter, F.; Potnis, N.; Jones, J.; Van, S.; Bogdanove, A. and Dow, J. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Microbiology journal*, 9(5), 344-55.
- Rodríguez , S.; Albarracín, N .; Arjona, A.; Albarracín , M. y Hernández , Y. (2002). Diagnóstico postcosecha de enfermedades bacterianas en zanahoria. *Fitopatología Venezuela*, 15 (1), 17-20.

Russi, P.; Menoni, M.; del Campo, R. y Peyrou, M. (2013). Caracterización de cepas de *Xanthomonas citri* sbsp. *citri*, agente causal del cancro cítrico. *Agrociencia Uruguay*, 17(2) ,64-74.

Salazar, E.; Nieves, B.; Ruiz, J. y Vila J. (2008). Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género *Acinetobacter* y otros bacilos Gramnegativos no fermentadores. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, (28), 89-95

Schaad, N.; Vidaver, A.; Lacy, G.; Rudolph, K. and Jones, J. (2000). Evaluation of proposed amended names of several pseudomonads and xanthomonads and recommendations. *Phytopathology*, 90 (3), 208-213.

Sambrook, J.; Fritschi, E.; Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. USA.

Sambrook, J.; Russell, D. (2011). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.

Sanderson, G. and Clarke R. (1983). Gellan gum. *Food technology* (37): 63 – 70.

Seplu Cempo. (2010). VIII Seminario Internacional de Fluidos de Perforación, Complementación y Cementación de pozos. *Petroleum* 250, 30-36.

Slodki, M. and Cadmus, M. *Adv. Appl. Microbiol.* 1978; (23): 19.

Stackebrandt, E.; Ebers J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33, 152-155.

Starr M., J. Bacteriol. 1946; (51): 131 – 143.

Sutherland, I., (1990). Biotechnology of microbial exopolysaccharides, (9).

Sutherland, I. (2001) Microbial polysaccharide from gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, (11), 663 – 674.

Torrestiana, B., Fucikovsky L. and Galindo E. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1990; (10): 81 – 83.

Vauterin, L.; Radermaker, L. and Swings, J. (2000). Synopsis on the Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 90 (7), 677-682.

Velasquez, N.; Trujillo, G.; Hernandez, Y. y Moreno, N. (1988). Bacteriosis en ocumo (*xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) ocasionada por *xanthomonas* sp. *Revista de agronomia tropical*, 38(4-6), 49-56.

Vidhyasekaran, P. (2002). *Bacterial disease resistance in plants. Molecular biology and biotechnological applications*. New York.

Voloudakis, A.; Reignier, T. and Cooksey, A. (2005). Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *American Society for Microbiology*. 71, (2), 782-789.

- Weng, S.; Lin, W.; Chen, C.; Chen, Y.; Tseng, Y. and Tseng, H. (2004). Constitutive Expression of a Chromosomal Class A (BJM Group 2) β -Lactamase in *Xanthomonas campestris*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48 (1), 209-215.
- Xu, Y.; Lou, Q. and Zhou, M. (2013). Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance in the Phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Plos one journal*, 8 (2), 1-12.
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal Computational Biology*, 7 (1-2), 203-2014.
- Zhang, H. and Wang, S. (2013). Rice versus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: a unique pathosystem. *National Center of Plant Gene Research*, 16(2), 188-95.
- Zapata, M. y Gaud, R. (2001). Estrategias para diferenciar *xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* con sales inorgánicas. *Agronomía mesoamericana*, 12 (1), 01-07.
- Zuleta, C.; Kelemu, S. y Cardozo, O. (2002). Identificación de fuentes de resistencia a *Xanthomonas campestris* en *Brachiaria spp.* *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología Costa Rica*, 64, 41-47.

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo

1. Medio Luria-Bertani (LB) :

- Triptona 10 gr.
- Extracto de levadura 5 gr.
- NaCl 10 gr.
- H₂O destilada 1 L.

2. Medio Levadura, Dextrosa, Calcio (YDC)

- Extracto de levadura 10 gr.
- Carbonato de Calcio 20 gr.
- Agar 15 gr
- Dextrosa 20gr.
- H₂O destilada 1 L.